



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

**Concordancia entre la técnica de hemaglutinación  
indirecta e inmunoabsorción ligado a enzimas en el  
diagnóstico de toxoplasmosis porcina**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario**

**AUTOR**

**Marlene GONZÁLES LLANTOY**

**ASESOR**

**Eva Consuelo CASAS ASTOS**

**Lima, Perú**

**2017**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## **Referencia bibliográfica**

---

Gonzáles M. Concordancia entre la técnica de hemaglutinación indirecta e inmunoabsorción ligado a enzimas en el diagnóstico de toxoplasmosis porcina [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2017.

---



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú, Decana de América  
Facultad de Medicina Veterinaria  
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día miércoles 06 de diciembre de 2017, a las 10:00 horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0237-EPMV/FMV-2017, integrado por los siguientes profesores:

ALBERTO MANCHEGO SAYÁN	Presidente del Jurado
EVA CONSUELO CASAS ASTOS	Asesora de la Tesis
ANTONIO AMPUERO BUSTILLO	Miembro del Jurado
ROSA PINEDO VICENTE	Miembro del Jurado

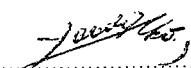
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: GONZÁLES LLANTOY, MARLENE para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

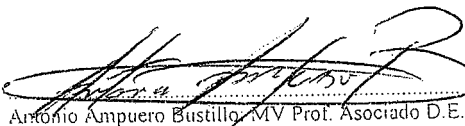
### “CONCORDANCIA ENTRE LA TÉCNICA DE HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA E INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS EN EL DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSIS PORCINA”

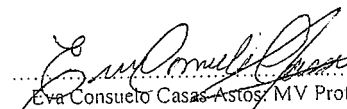
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesora de la Tesis y acordó su APROBACIÓN por UNANIMIDAD, otorgándole la nota de DIECIOCHO ( 18 ).

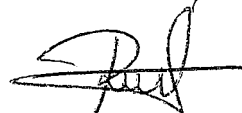
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

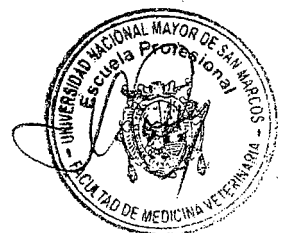
Siendo las 11:10 horas, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

  
Alberto Manchego Sayán: Mg. Prof. Principal, D.E

  
Antonio Ampuero Bustillo: MV Prof. Asociado D.E.

  
Eva Consuelo Casas Astos: MV Prof. Asociado T.C.

  
Rosa Pinedo Vicente: MV Prof. Auxiliar T.C.



## **DEDICATORIA**

Se que desde donde esta, sonrío por mis logros, asi como en silencio y con esa mirada que dice mil cosas y que aprendí desde muy pequeña a leer y entender, me insita a seguir para lograr mis metas. Siempre fue un pilar, una fuerza, un faro, un motivo, un ejemplo.

Asi es que, este símbolo de cumplir una parte de mi camino, te lo dedico a ti Mamita, nadie, a pesar de los y lo mucho que me aprecian, se que sentirá y disfrutará mas mis logros que, tú.

¡Siempre te tengo conmigo!

## **AGRADECIMIENTOS**

No podría ser honrada sin reconocer mi gratitud a Dios, quien trazo mi camino y me permitió escoger y llenar mi andar, de gente maravillosa: Gracias.

Agradecer a mi Alma Mater: San Marcos, por acogerme en su ser y moldear mis aprendizajes a través de mis maestros ahora entrañables amigos, y a través de mis compañeros de risas y saberes nuevos, que marcaron al futuro profesional en el que me he convertido. Imposible nombrarlos a todos, pero guardo sus recuerdos con marca de fuego en mi corazón: Gracias.

Agradecer a mi Familia, a la de sangre y a la escogida del corazón por su apoyo, por la motivación intrínseca en sus expectativas, por la paciencia y la confianza a veces en silencio, a veces con fuerza: Gracias.

## ÍNDICE

	<b>Pág</b>
<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	v
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1. Antecedentes Históricos.....	3
2.2. Etiología.....	5
2.2.1. <i>Taxonomía</i> .....	5
2.2.2. <i>Morfología</i> .....	5
• <i>Taquizoito</i> .....	5
• <i>Bradizoito y Quiste tisular</i> .....	6
• <i>Ooquiste</i> .....	7
2.3. Ciclo Biológico.....	8
2.3.1. <i>Fase Enteroepitelial o Intestinal</i> .....	8
2.3.2. <i>Fase Esporogónica</i> .....	9
2.3.3. <i>Fase Extraintestinal o Tisular</i> .....	9
2.4. Epidemiología.....	11
2.4.1. <i>Parásito</i> .....	11
2.4.2. <i>Hospedador</i> .....	12
2.4.3. <i>Medio Ambiente</i> .....	13
2.5. Importancia en la Salud Pública.....	14
2.6. Prevalencia.....	14
2.7. Patología.....	17
2.8. Inmunología.....	19
2.8.1. <i>Respuesta Inmune Humoral</i> .....	19
2.8.2. <i>Respuesta Inmune Celular</i> .....	21
2.8.3. <i>Respuesta Inmune de Toxoplasma gondii</i> .....	22
2.9. Signos Clínicos.....	23

2.10. Diagnóstico.....	24
2.10.1. Diagnóstico Serológico.....	24
• Prueba de Sabin y Feldman o Dye Test (RSF).....	24
• Hemaglutinación Indirecta (HAI).....	24
• Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	25
• Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).....	25
• Técnica de Aglutinación Modificada (MAT).....	27
• Técnica de Inmunotransferencia o Inmunoblot (WB).....	28
2.10.2. Diagnóstico no serológico.....	28
• Aislamiento del parásito.....	28
• Examen Microscópico.....	29
• Inmunohistoquímica (IHQ).....	29
• Reaccion en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	30
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. Lugar y Tiempo.....	31
3.2. Animales en estudio.....	31
3.3. Tamaño Muestral.....	31
3.4. Toma de Muestras .....	31
3.5. Laboratorio.....	32
3.5.1. Materiales y Equipos.....	32
3.5.2. Determinación de anticuerpos contra <i>T. gondii</i> .....	32
3.6. Análisis de la Información.....	33
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>VIII. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>43</b>



## RESUMEN

La toxoplasmosis es una enfermedad producida por el *Toxoplasma gondii* un protozooario intracelular de distribución mundial, que afecta una amplia gama de hospederos intermediarios entre ellos la especie porcina; especie que desempeña un rol importante en la transmisión de la enfermedad al hombre dado que tiene manifestaciones clínicas diferentes e inespecíficas, por lo tanto el diagnóstico de esta enfermedad debe contar con el apoyo de las pruebas inmunológicas adecuadas, actualmente existen dos pruebas la hemaglutinación indirecta (HIA) y el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) utilizadas frecuentemente en Medicina veterinaria. En ese sentido el objetivo del presente estudio fue determinar la concordancia entre las pruebas de HAI y ELISA, para detectar IgG anti-*Toxoplasma gondii* en el diagnóstico de Toxoplasmosis porcina. El trabajo se desarrolló en 407 animales provenientes de crías porcinas ubicadas en la franja costera del departamento de Lima. Se colectaron las muestras de sangre de cerdos en la fase de acabado, posteriormente las muestras de suero fueron conservadas en congelación (-70°C) hasta su procesamiento en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. La concordancia de las técnicas diagnósticas y la seroprevalencia correspondiente se evaluaron mediante dos diferentes modelos estadísticos Índice de Kappa y la prueba de McNemar. En los resultados se halló que la concordancia entre las pruebas de HAI-ELISA a través del índice de Kapa fue igual a 26% considerándose de tipo regular, con valores de  $18.7 \pm 3.8\%$  por el método de HAI, y  $14.7 \pm 3.4\%$ , por el método de ELISA; sin embargo, mediante la prueba de McNemar no se encontró diferencias significativas y sugerirían que ambas técnicas son mutuamente reemplazables. Concluyendo que, como la correlación es regular, no se recomienda.

**Palabras clave:** porcinos, *Toxoplasma gondii*, ELISA indirecta, HAI.

## ABSTRACT

Toxoplasmosis is a disease caused by *Toxoplasma gondii*, an intracellular protozoon of worldwide distribution, which affects a wide range of intermediate hosts, including the porcine species; species that plays an important role in the transmission of the disease to man given that it has different and nonspecific clinical manifestations, therefore the diagnosis of this disease must be supported by adequate immunological tests, currently there are two indirect hemagglutination tests (HIA) and the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) frequently used in veterinary medicine. In this sense, the objective of the present study was to determine the concordance between HAI and ELISA tests, to detect anti-*Toxoplasma gondii* IgG in the diagnosis of porcine toxoplasmosis. The work was developed in 407 animals from porcine breeding located in the coastal strip of the department of Lima. Blood samples were collected from pigs in the finishing phase, later the serum samples were kept in freezing ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) until processing in the Parasitology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of the UNMSM. The concordance of the diagnostic techniques and the corresponding seroprevalence were evaluated by means of two different statistical models Kappa index and the McNemar test. In the results it was found that the agreement between the HAI-ELISA tests through the Kapa index was equal to 26% considering the regular type, with values of  $18.7 \pm 3.8\%$  by the HAI method, and  $14.7 \pm 3.4\%$ , by the ELISA method; however, through the McNemar test no significant differences were found and they would suggest that both techniques are mutually replaceable. Concluding that, as the correlation is regular, it is not recommended

**KEYWORDS:** swine, *Toxoplasma gondii*, indirect ELISA, HAI.

## LISTA DE CUADROS

		Pág.
<b>Cuadro 1.</b>	Seroprevalencia mundial de <i>Toxoplasma gondii</i> en porcinos domésticos.....	22
<b>Cuadro2.</b>	Seroprevalencia mundial de <i>Toxoplasma gondii</i> en porcinos silvestres.....	25
<b>Cuadro 3.</b>	Pruebas ELISA desarrolladas para el diagnóstico de infección por <i>Toxoplasma gondii</i> en porcinos.....	39
<b>Cuadro 4.</b>	Distribucion de sueros según los resultados de las técnicas de HAI y ELISA indirecto para la detección de <i>Toxoplasma gondii</i> en cerdos procedentes de Lima-Perú, 2015.....	56
<b>Cuadro 5.</b>	Seroprevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en cerdos procedentes de Lima-Perú, 2015 mediante las técnicas de Hemaglutinacion Indirecta y ELISA indirecto.....	79

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b>	Esquema comparativo del Taquizoito y Bradizoito de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	6
<b>Figura 3.</b>	Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	10

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo 1.</b> Consentimiento Informado para los propietarios de crianzas porcinas. Lima-Perú.....	97
<b>Anexo 2.</b> Protocolo de ELISA indirecto. Priocheck <i>Toxoplasma</i> Ab porcine .....	98
<b>Anexo 3.</b> Protocolo de HAI Toxotest.....	103

## I. INTRODUCCIÓN

*Toxoplasma gondii* es un protozoo intracelular obligado de distribución mundial, que tiene a los felinos domésticos y silvestres como hospedadores definitivos y una amplia gama de vertebrados como hospedadores intermediarios, la ingestión de carne cruda o mal cocida, infectada con quistes tisulares, o el consumo de alimentos y agua contaminados con ooquistes esporulados son las rutas más comunes de infección (López *et al.*, 2007; Dubey y Jones, 2008).

La toxoplasmosis es una enfermedad clínicamente asintomática; sin embargo, la primoinfección durante la gestación tanto en humanos como animales puede causar abortos, anomalías en el feto o muerte perinatal (Gilbert *et al.*, 2000). La infección se encuentra ampliamente distribuida en América Latina, principalmente en países tropicales de clima caliente y húmedo, ocurriendo también en regiones frías del Ártico y Alaska (Sobral *et al.*, 2005).

La infección por *T. gondii* tiene manifestaciones clínicas diversas e inespecíficas, lo que hace difícil poder precisar el diagnóstico con certeza, por lo que se debe tener cuidado con el diagnóstico diferencial (Dubey, 1990). Como en muchas enfermedades infecciosas, sobre todo en aquellas que a veces son clínicamente inaparentes, el diagnóstico se basa en pruebas indirectas como la serología que consiste en la determinación de anticuerpos específicos contra el parásito (Bastien, 2002).

Entre las pruebas serológicas disponibles para el diagnóstico de toxoplasmosis se tienen las pruebas de fijación de complemento (Nicolaus y Ravelo, 1937), Sabin

Feldman (Sabin y Feldman, 1948), Hemaglutinación (Jacobs y Lunde, 1957), Inmunofluorescencia (Goldman, 1957) y ELISA (Venkatesan y Wakelin, 1993).

Sin embargo, es la prueba de Hemaglutinación Indirecta (HAI) que viene siendo utilizado para el diagnóstico de rutina en clínicas y hospitales veterinarios (Behymer *et al.*, 1973), por ofrecer resultados rápidos y una mayor facilidad de ejecución e interpretación de resultados (Suárez *et al.*, 2002).

Por otro lado, el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), ha mostrado claras ventajas sobre otras pruebas, dado que se pueden analizar muchas muestras en forma simultánea con poco equipo sofisticado, comparado con la prueba de inmunofluorescencia, y los resultados obtenidos ofrecen mayor confiabilidad que las obtenidas con la hemaglutinación (Waltman *et al.*, 1984). Además, posee alta sensibilidad y especificidad detectando tanto infecciones recientes como latentes (Romero *et al.*, 1995).

En la actualidad, los métodos indirectos vienen siendo usados por diversos laboratorios de forma rutinaria, y tomando en cuenta que estos poseen diferentes sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *Toxoplasma gondii*, el objetivo del presente estudio fue determinar la concordancia entre las pruebas de Hemaglutinación Indirecta (HAI) y el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) para el diagnóstico de *Toxoplasma gondii* en cerdos.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Antecedentes Históricos

El Toxoplasma fue descubierto simultáneamente por Splendore en 1908 en un conejo de laboratorio en Sao Paulo, en Brasil, y por Nicolle y Mancelaux, en el gundi, roedor africano entonces usado en la búsqueda de la Leishmaniasis en el Instituto Pasteur de Túnez (Meireles, 2001). Pero un año después lo descartaron y se dieron cuenta que habían descubierto un nuevo organismo al que denominaron *Toxoplasma gondii* por su forma arqueada (del griego toxon = arcos) y por el nombre vulgar del roedor en el que fue hallado (Dubey, 2007). En los siguientes 30 años, *T. gondii* fue hallado en varios hospedadores, principalmente especies aviares (Dubey, 2007); sin embargo, el primer *Toxoplasma* viable fue aislado por Sabin y Olitsky (1937) que utilizaron protección cruzada para demostrar que también infectaba a humanos.

En 1940 se encontraron anticuerpos contra taquizoítos extracelulares, pero no intracelulares, y en los siguientes 50 años se encontró que la protección contra *T. gondii* principalmente es mediada por inmunidad celular (Gazzinelli, *et al* 1991). Simultáneamente, Farrell *et al* (1952) reportaron por primera vez *T. gondii* en cerdos de Ohio, EE.UU., con una prevalencia del 30%.

Sabín y Feldman (1948) establecieron la primera prueba serológica para el diagnóstico de la toxoplasmosis, basada en la inhibición de la coloración que experimentan los toxoplasmas cuando se ponen en contacto con anticuerpos específicos y



un año después Frenkel descubrió una prueba de hipersensibilidad muy útil para las formas crónicas y para los estudios epidemiológicos.

La toxoplasmosis en porcinos fue diagnosticada por primera vez en 1952 en los EEUU por Farell *et al.* (1952) quienes encontraron mortalidad en todos los grupos etarios.

Durante muchos años fue encontrado en numerosas especies de vertebrados, pero el hospedero definitivo se mantuvo desconocido hasta que Hutchinson (1965), se halló una forma quística de *T. gondii* en heces de gato. Mas adelante, gracias a investigadores como Work y Siim en Dinamarca, Frenkel *et al.* en Estados Unidos de Norteamérica y Piekarski y Wite en Alemania, quedo demostrado el ciclo sexual en el intestino del gato (Amato Neto *et al.*, 1995).

Durante los años 1980 y 1990 se desarrollaron diversos métodos para reconocer las diferencias genéticas de *T. gondii* aislados de humanos y animales (Howe y Sibley, 1995), recientemente se ha logrado un mapeo de genes, que ayudarían en el hallazgo de nuevos antígenos para determinar el diagnóstico, protección y mecanismo de la enfermedad (Khan *et al.* 2005).

No existen datos sobre la distribución real de *T. gondii* a nivel mundial, sin embargo, se estima que un tercio de la población humana puede haber entrado en contacto con este parásito (Tenter *et al.*, 2000). Las personas fundamentalmente pueden infectarse por vía congénita, por ingestión de carne infectada poco cocinada y por consumo de alimentos (sobre todo verduras) o agua contaminados con ooquistes (Dubey y Jones, 2008). En este sentido, las encuestas seroepidemiológicas realizadas señalan el consumo de carne de origen porcino contaminada con quistes de *T. gondii* como la fuente de contagio más importante en la población humana (García-Bocanegra *et al.*, 2010).

## **2.2.Etiología**

### **2.2.1. Taxonomía**

La posición sistemática de este parásito ha variado a lo largo de los años, prevaleciendo el criterio seguido por Levine en 1973 y aceptado por Frankel en 1977:

- Reino: Protozoa
- Phylum: Apicomplexa
- Clase: Sporozoea
- Subclase: Coccidia
- Orden: Eucoccidea
- Suborden: Eimeriina
- Familia: Sarcocystidae
- Subfamilia: Toxoplasmatinae
- Género: Toxoplasma
- Especie: *Toxoplasma gondii*

### **2.2.2. Morfología**

#### **▪ Taquizoítos**

El taquizoíto (del griego tachos= rápido, velocidad) fue la primera forma del *T. gondii* descrita, por ser de proliferación rápida y hallada más fácilmente en líquidos biológicos (Amato Neto *et al.*, 1995). Presenta forma de semiluna y mide 2-4  $\mu\text{m}$  de ancho y 4-7  $\mu\text{m}$  de largo (Dubey, 2010).

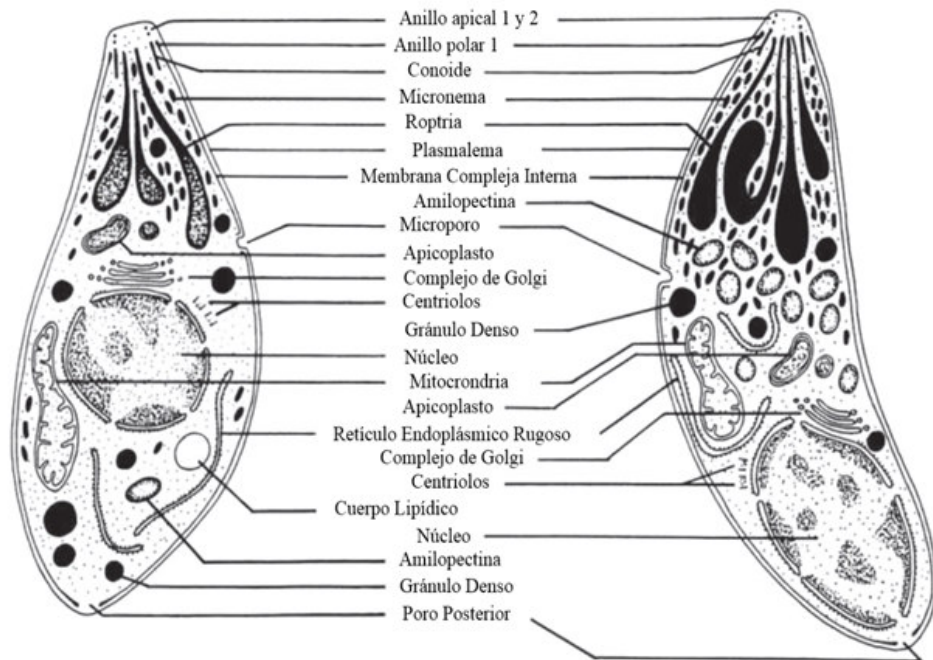
Las funciones del conoide, roptrias, microporos y micronemas no están completamente esclarecidas, pero están probablemente asociadas con la penetración a la célula hospedera y con la creación de un ambiente intracelular adecuado para el crecimiento y desarrollo del parásito (Dubey, 2010).

- ***Bradizoito y Quiste tisular***

Los bradizoitos (del griego bradi = lento) se desarrollan a partir de los taquizoitos tras el establecimiento de la respuesta inmune del hospedador. Los mismos que están incluidos en las formas quísticas tisulares que son formaciones redondeadas, pudiendo adoptar formas poligonales por la presión ejercida por los tejidos próximos. Los quistes tisulares en el cerebro son a menudo esféricos y raramente alcanzan un diámetro de 70µm, mientras que los quistes intramusculares son elongados y pueden medir 100µm de largo (Dubey, 2010).

La pared es elástica y delgada (<0,5 µm de espesor) y encierra cientos de bradizoitos con forma de media luna, cada uno de aproximadamente 7 x 1,5 µm en tamaño. Es argirófila y ligeramente PAS positiva. Está compuesta de materiales de la célula hospedera y del parásito. Por último, el quiste tisular está revestido por un material granular, el cual también ocupa el espacio entre los bradizoitos. Algunos bradizoitos degeneran, especialmente en los quistes tisulares más viejos (Dubey, 2010).

A diferencia de los taquizoitos, los bradizoitos son más delgados, tienen un núcleo posterior y son menos susceptibles a la destrucción por enzimas proteolíticas, además poseen mayor cantidad de gránulos de amilopectina que se tiñen de color rojo con el reactivo PAS (Dubey, 2004). Los quistes tisulares, soportan sin problemas temperaturas de 45° C y la acidez gástrica (Gómez, 2004).



**Figura 1.** Esquema comparativo del Taquizoíto y Bradizoíto de *Toxoplasma gondii*.  
(Adaptado de Dubey, 2010).

#### ▪ *Ooquiste*

El ooquiste es la forma de resistencia en el medio exterior, resultante del ciclo gametogónico o sexuado del parásito que tiene lugar en el intestino del gato y otros félidos salvajes. Los ooquistes no esporulados son subsféricos a esféricos y miden de 10 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro. La pared consta de dos láminas, los gránulos polares están ausentes y el esporonte ocupa casi todo el ooquiste. Por otra parte, los ooquistes esporulados son subsféricos a elipsoidales y miden de 11 a 13  $\mu\text{m}$  de diámetro, su pared consiste de 3 láminas: una lámina externa electrodensa, una lámina media electrolúcida y una lámina interna moderadamente electrodensa, cada ooquiste esporulado contiene dos esporoquistes elipsoidales con residuo y sin cuerpo de Stieda, los cuales miden aproximadamente de 6 a 8  $\mu\text{m}$ . Cada esporoquiste contiene 4 esporozoítos (Dubey, 2010).

Los ooquistes son sensibles al yodo y al formol, pero son resistentes a la mayor parte de los desinfectantes y al jugo gástrico. Son inactivados con temperaturas superiores a los 66° C en menos de 10 minutos (Gómez, 2004).

### **2.3.Ciclo Biológico**

*Toxoplasma gondii* tiene un ciclo biológico muy complejo con diferentes formas invasivas, tanto en el hospedador definitivo como en el intermediario. Los diferentes zoitos (esporozoítos, taquizoítos, bradizoítos), fruto de las distintas modalidades de reproducción, tienen forma constante y están capacitados para penetrar en una nueva célula del hospedador y proseguir el ciclo biológico (Martínez-Fernández *et al.*, 1998).

#### **2.3.1. Fase enteroepitelial o intestinal**

Se realiza solo en el hospedero definitivo como felinos domésticos y silvestres (Leguía y Casas, 1999), el ciclo se inicia con la ingestión de quistes bradizoítos mediante carnivorismo de presas infectadas, ooquistes esporulados por contaminación y en menor medida por taquizoítos. Después de la ingestión de quistes tisulares, la pared quística se disuelve por las enzimas proteolíticas gastrointestinales. Los bradizoítos liberados penetran en las células epiteliales del intestino delgado e inician el desarrollo de numerosas generaciones de *T. gondii*. Cinco tipos morfológicamente distintos (tipo A, B, C, D y E) llamados estadios multiplicativos por Frenkel (1978) se desarrollan en las células epiteliales y se dividen por reproducción asexual: endodiogenia, endopoligenia o esquizogonia. Posteriormente se realiza la reproducción sexual o gametogonia, en la cual los merozoítos liberados de los tipos D ó E forman el microgamonte y macrogamonte, el primero a su vez se divide para formar microgametos biflagelados, que se movilizan para penetrar al macrogameto, una vez producida la fertilización se origina el cigoto que se reviste de una cubierta para formar el ooquiste, que rompen la célula del epitelio intestinal y será eliminado en las heces (Dubey y Lappin, 2000; Rojas, 2003).

El periodo prepatente (PPP) varía de acuerdo al estadio ingerido, después de la ingestión de quistes tisulares o bradizoítos el PPP es corto (3 – 10 días) y más del 97% de felinos infectados eliminan ooquistes (Dubey y Lappin, 2000). En el caso de la ingestión de taquizoítos u ooquistes esporulados el PPP es más largo ( $\geq 18$  días), independientemente

del número de organismos en los inóculos (Dubey *et al.*, 2005). Además, menos del 50% de gatos eliminan ooquistes después de ingerir taquizoitos u ooquistes esporulados (Dubey, 2001). El periodo patente dura de 1 a 3 semanas en condiciones normales, y se produce una sola vez en la vida del gato, pero en caso de inmunodepresión pueden presentarse nuevas infecciones. En este periodo, la capacidad de contaminación ambiental es muy grande, alcanzando cantidades superiores a los 100 000 ooquistes por gramo de heces (Rojas, 2003).

Según la hipotesis postulada por Dubey y Frenkel en 1976, los taquizoitos y esporozoitos realizan primero un ciclo extraintestinal obteniendo como resultado final quistes tisulares con bradizoitos. Algunos quistes tisulares se rompen en un determinado momento y los bradizoitos liberados vuelven al intestino, iniciando el ciclo enteroepitelial como si hubiese accedido al hospedero por vía oral (Ortega-Mora, 1997)

### ***2.3.2. Fase esporogónica***

La esporulación se produce fuera del gato después de 1 a 5 días de expulsar los ooquistes, depende de la aireación y la temperatura. El ooquiste esporulado tiene forma subesférica a elipsoidal y mide 11 a 13  $\mu\text{m}$  de diámetro. Cada ooquiste esporulado contiene dos esporoquistes elipsoidales sin cuerpos Stieda, que miden 6 a 8  $\mu\text{m}$ , presenta residuos de esporoquiste y cada esporoquiste contiene cuatro esporozoitos (Dubey, 2010).

### ***2.3.3. Fase extraintestinal o tisular***

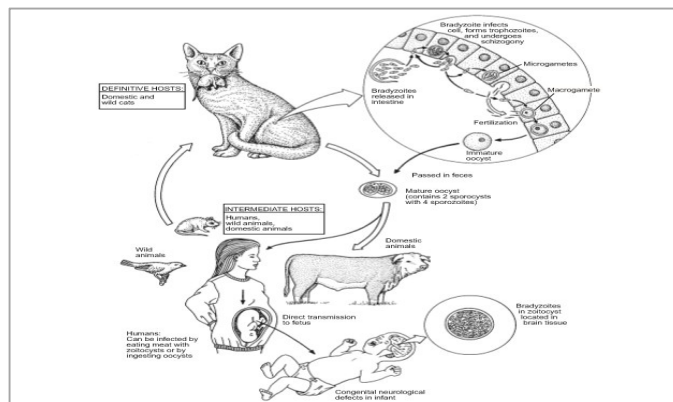
Esta fase tiene lugar en los hospedadores intermediarios, como los animales de sangre caliente (mamíferos y aves), incluyendo a los felinos (Rojas, 2003; Rivera y Mondragón, 2010). Después de la ingestión de ooquistes esporulados, los esporozoitos se liberan y penetran en los enterocitos y células caliciformes del epitelio intestinal, además de ubicarse en la lámina propia a través de un mecanismo desconocido (Dubey, 2010).

Los esporozoitos se multiplican en el interior de una vacuola parasitófora 2 horas post infección, por un proceso asexual de división celular conocido como endodiogenia, por el cual se forman dos parásitos de una célula madre. Al saturar el espacio

intravacuolar, los nuevos zoitos salen de la célula destruyéndola e invadiendo células vecinas (Atías, 1994; Dubey, 2010).

En las siguientes dos horas, algunas células se localizan en sangre periférica circulante, diseminándose vía hemática o linfática, donde parasitan cualquier célula nucleada, con mayor afinidad por las células del sistema retículo endotelial, sistema nervioso central y células musculares (Dubey, 2010). Las células resultantes de la multiplicación intracelular acelerada reciben el nombre de Taquizoítos, que concluyen con la formación de pseudoquistes, es decir, células hospedadoras con abundantes parásitos (Atías, 1994). Durante la diseminación tisular de *Toxoplasma gondii*, se activa el sistema inmune con la participación de citocinas tales como interferón gama, factor de necrosis tumoral y óxido nítrico, que activan mecanismos moleculares que resultan en la diferenciación de los taquizoítos en bradizoítos con la consecutiva transformación de la célula infectada en un quiste tisular (Rivera y Mondragón, 2010).

Los bradizoítos, células de reproducción lenta (Frenkel, 1990) segregan precipitados granulares que se adosan a la membrana vacuolar circundante, esta membrana se expande lentamente a medida que se multiplican en su interior los quistozoítos. Por último, al fusionarse las granulaciones, se forma una membrana sólida, la membrana quística, en este caso se trata de quistes verdaderos, cuya membrana envolvente deriva de componentes del parásito y de la célula hospedadora (Atías, 1994).



**Figura 2.** Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*  
(Roberts y Janovy, 2009)

## 2.4.Epidemiología

La toxoplasmosis es una zoonosis parasitaria de distribución cosmopolita con gran impacto clínico en mamíferos y aves, incluyendo al hombre, feto e individuos inmunosuprimidos (Romero y Sogbe, 2005; Klun *et al.*, 2006). Se han descrito elevadas prevalencias en países latinoamericanos como Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, Panamá, México y Venezuela (Díaz *et al.*, 2003; López *et al.*, 2007).

Dentro de sus hospedadores intermediarios de *T. gondii*, los herbívoros y omnívoros son epidemiológicamente los más eficaces, en todos ellos la ingestión de ooquistes representa la principal o única vía de infección. Tanto los quistes tisulares (bradizoítos) presentes en músculos y vísceras como los ooquistes fecales de félidos son importantes para mantener la infección en la naturaleza. Los taquizoítos desempeñan una función importante en la transmisión intrauterina de varias especies animales incluidas al hombre (Acha y Szyfres, 2003).

### 2.4.1. Parásito

Las principales formas para la infección con *Toxoplasma gondii* son la ingestión de ooquistes esporulados y dispersos en el medio ambiente, así como de quistes tisulares con la carne no tratada químicamente y físicamente (Tenter, 2009).

El ooquiste constituye el eslabón más importante de la cadena epidemiológica de la toxoplasmosis (Dubey, 1994), estos son dispersados en el medio ambiente a través de los vientos, lluvias, aguas superficiales, pasturas naturales, forrajes cosechados como heno, paja y granos que han sido contaminados por heces de felinos domésticos y silvestres que eliminan estos ooquistes durante 3 a 21 días post-infección (Tenter *et al.*, 2000). Asimismo, en su propagación juegan un papel importante los vectores mecánicos como las cucarachas, moscas, gusanos de tierra y escarabajos (Hill *et al.*, 2005).

El ooquiste tiene mayor capacidad infectiva que los bradizoítos y taquizoítos a través de la infección oral. Sin embargo, los taquizoítos desempeñan una función en la transmisión intrauterina de varias especies animales incluidas al hombre (Acha y Szyfres,



2003). Las formas de transmisión en la naturaleza pueden ser por ingestión de alimentos o agua contaminada con ooquistes esporulados (Dubey, 2004), ingestión de tejidos infectados con quistes (Tenter *et al.*, 2000) y taquizoítos por carnivorismo y necrofagia, siendo la fuente más importante de contagio para los felinos domésticos y silvestres, las aves y roedores silvestres que han padecido la forma crónica de la enfermedad y poseen quistes a nivel tisular (Dubey, 1994; Venturini *et al* 1997). Otras modalidades menores de transmisión incluyen la transfusión de líquidos o trasplantes de órganos (Dubey y Lappin, 2000), y la ingestión de leche no pasteurizada o de huevos conteniendo taquizoítos (Dubey, 2004).

El ooquiste de *Toxoplasma gondii* son altamente resistente a las condiciones medioambientales, incluyendo la congelación. Los ooquistes no son destruidos por tratamientos químicos y físicos que se aplican actualmente en plantas de tratamiento de agua, incluyendo cloración, tratamiento con ozono, y rayos ultravioleta (Dubey, 2010).

El Taquizoito juega un papel importante en la transmisión vertical del *Toxoplasma gondii* y es, muy sensible a condiciones medioambientales, deshidratación y variaciones osmóticas. Por lo que son rápidamente eliminados fuera del hospedero (Tenter *et al.*, 2000).

Respecto a los quistes tisulares, pueden permanecer viables en los tejidos de animales hasta por 3 semanas a 4°C y, a más de 20°C por 3 días; pueden conservar su vitalidad en los órganos de animales muertos (Hill y Dubey, 2002). Por esta razón la prevalencia de quistes en carnes es baja (0.38%); sin embargo, representa una fuente de infección importante hallándose principalmente en carne porcina (Dubey *et al.*, 2005).

#### **2.4.2. Hospedador**

Los felinos domésticos y silvestres actúan como hospederos definitivos de *Toxoplasma gondii*, y por lo tanto desempeñan un papel clave en la epidemiología de la infección. La mayoría de felinos se infectan después del nacimiento, ya sea por la ingestión de tejidos infectados u ooquistes esporulados, siendo la primera la forma de transmisión más efectiva (Dubey, 2006). Los animales infectados diseminan ooquistes en el medio ambiente contaminando granjas y establos infectando al ganado (Tenter *et al.*, 2000). Se

dice que los felinos domésticos eliminan millones de ooquistes por cada quiste tisular ingerido, tomando en cuenta que animales reservorios como los roedores poseen muchos quistes internamente (Dubey, 2001). Para adquirir inmunidad posteriormente y convertirse en portadores sanos (Dubey *et al.*, 1995).

En un determinado momento, aproximadamente el 1% de los gatos se espera que elimine ooquistes, basandose en la observación de que la mayoría de los gatos sólo arrojan ooquistes durante aproximadamente una semana en su vida (Dubey, 2004).

En el pasado, el consumo de carne cruda o poco cocida, especialmente carne de cerdos y ovinos, era considerada como una ruta importante de transmisión a los seres humanos; sin embargo, la prevalencia de *T. gondii* en animales de producción disminuyó considerablemente en áreas con manejo intensivo. Por ejemplo, en varios países de la Unión Europea, las prevalencias de *T. gondii* en porcinos son actualmente <1%. Teniendo en cuenta estos datos, es poco probable que el cerdo sea una importante fuente de infección para los seres humanos en estos países. Sin embargo, es probable que las principales vías de transmisión sean diferentes en las poblaciones humanas con diferentes tipos de cultura y hábitos alimenticios (Tenter *et al.*, 2000)

#### **2.4.3. Medio Ambiente**

Las características del medio influyen en la prevalencia, siendo mayor en regiones cálidas y/o húmedas, y más baja en climas secos y fríos; también hay diferencias en las tasas de positividad con relación a la altitud, correspondiendo las más altas a las áreas de mayor elevación sobre el nivel del mar (Martín-Hernández y García-Izquierdo, 2003).

Los ooquistes no esporulados pueden sobrevivir a bajas temperaturas hasta por 3 meses, reteniendo su habilidad para convertirse en infecciosos, cuando se presentan las condiciones ambientales apropiadas (Lindsay *et al.*, 2002). Por otro lado, el instinto natural de los gatos para enterrar u ocultar sus heces proporciona un ambiente protegido, logrando sobrevivir durante 18 meses (Frenkel *et al.*, 1975). Cuando los ooquistes encuentran condiciones favorables en el ambiente externo (agua, terreno húmedo, temperatura de alrededor de 25° C y suficiente oxígeno) alcanzan su estado infectante en un lapso de 1-3

días. Esto ayuda a explicar la alta prevalencia de la toxoplasmosis en zonas templadas, tropicales y subtropicales (Leguía, 2002).

Las condiciones climáticas (altas temperaturas, precipitación media y humedad relativa media) se relacionan significativamente con una alta seroprevalencia, ya que favorecen la esporulación y supervivencia de ooquistes de *T. gondii* facilitando su propagación y mantenimiento en el medio ambiente (Dubey y Beattie, 1988). Finalmente, los ooquistes pueden ser diseminados al medio ambiente por artrópodos y moluscos (Alfonso *et al.*, 2008).

## **2.5.Importancia en la Salud Pública**

La toxoplasmosis es una zoonosis prevalente de importancia para la salud pública debido a los problemas asociados con la infección congénita y postnatal, siendo la principal causa de infecciones de retina en todo el mundo (Holland, 2003). En la mayoría de los adultos no se observan signos, pero puede causar ceguera después del nacimiento y retraso mental en los niños con infección congénita, además se observa manifestaciones devastadoras y muerte en individuos inmunocomprometidos, tales como pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Hill *et al.*, 2006).

El consumo de productos cárnicos crudos o poco cocidos que contienen quistes tisulares de *Toxoplasma gondii* o la ingestión de alimentos o bebidas contaminados con ooquistes esporulados representan fuentes infección de *T. gondii* al hombre (Dubey *et al.*, 2005).

## **2.6.Prevalencia**

*Toxoplasma gondii* se ha reportado a nivel mundial, donde la seroprevalencia en cerdos alcanza valores superiores a 10-20% en la mayoría de países (Gamble *et al.*, 2005). En Europa las cifras exceden 0,8 a 16% (Veronesi *et al.*, 2011; Turčekova *et al.*, 2013).

En el Cuadro 1 se detalla la seroprevalencia mundial de *Toxoplasma gondii* en porcinos domésticos, donde se puede observar cifras variadas debido a los diferentes sistemas de gestión, ubicación geográfica y pruebas serológicas. Así durante la última década se aprecia una reducción considerable de la seroprevalencia en países como Alemania (4.1%), Brasil (Paraná 4.0%), Estados Unidos (NAHMS 2.7%) y Taiwan (10.1%) que se atribuye al mejoramiento de la bioseguridad de las diferentes granjas (Dubey, 2009). Mientras que en Perú las frecuencias no presentan diferencias significativas.

**Cuadro 1.** Seroprevalencia mundial de *Toxoplasma gondii* en porcinos domésticos

País	Región	Test	Nº	%	Punto de corte	Referencia
Alemania		ELISA	1005	20.5	ND	Fehlhaber <i>et al.</i> , 2003
		ELISA	2041	18.5	ND	Damriyasa <i>et al.</i> , 2004
		ELISA	1500	9.3	ND	Damriyasa y Bauer, 2005
		ELISA	4999	4.1	ND	de Buhr <i>et al.</i> , 2008
Argentina		MAT	230	37.8	25	Venturini <i>et al.</i> , 2004
Brasil						
	Paraíba	IFI	130	36.2	50	Azevedo <i>et al.</i> , 2009
	Paraná	IFI	521	15.4	64	Tsutsui <i>et al.</i> , 2003
		IFI	424	4.0	64	Carletti <i>et al.</i> , 2005
	Río de Janeiro	IFI	38	65.8	ND	Fábregas <i>et al.</i> , 2006
	Rondônia	MAT	80	37.5	25	Cavalcante <i>et al.</i> , 2006
	São Paulo	ELISA	300	9.6	ND	Suárez-Aranda <i>et al.</i> , 2000
		IFI	80	43.7	64	Cavalcante <i>et al.</i> , 2006
Canadá						
	Ontario	ELISA	6048	0.74	ND	Poljak <i>et al.</i> , 2008
Chile		ELISA	340	8.8	ND	Balboa, 2008
China						
	Yun nan	HAI	831	16.9	64	Zou <i>et al.</i> , 2009
Eslovaquia		ELISA	320	8.1	50	Antolová <i>et al.</i> , 2007
España						
	Catalonia	MAT	1202	19.0	25	García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2010

EEUU						
	Mid west	ELISA	616	4.1	ND	Gebreyes <i>et al.</i> , 2008
	NAHMS	MAT	8086	6.0	32	Patton <i>et al.</i> , 2000
		ELISA	6238	2.7	ND	Hill <i>et al.</i> , 2009
Ghana		ELISA	641	40.6	ND	Arko-Mensah <i>et al.</i> , 2000
Indonesia		LAT	208	6.3	64	Inoue <i>et al.</i> , 2001
Italia		ELISA	3472	10.4	ND	Villari <i>et al.</i> , 2009
Malasia		IFI	100	0	200	Chandrawathani <i>et al.</i> , 2008
México						
	Durango	MAT	1074	12.7	25	Alvarado-Esquivel <i>et al.</i> , 2011
Países						Kijlstra <i>et al.</i> , 2008
Bajos		ELISA	406	10.9	ND	
Panamá		IFI	290	32.1	20	Correa <i>et al.</i> , 2008
Perú						
	Lima	HAI	105	25.2	ND	Bustamante y Suarez, 2000
		ELISA	96	32.3	ND	Suárez-Aranda <i>et al.</i> , 2000
		ELISA	93	33.3	ND	Suárez <i>et al.</i> , 2002
		WB	137	27.7	ND	Saavedra y Ortega, 2004
Polonia		MAT	106	26.4	40	Sroka <i>et al.</i> , 2008
Portugal		MAT	333	15.6	20	de Sousa <i>et al.</i> , 2006
República						
Checa		DT	259	0.4	4	Vostalová <i>et al.</i> , 2000
		IFI	20	20.0	64	Sedlák y Bártoová, 2007
Serbia		MAT	355	28.9	25	Klun <i>et al.</i> , 2006
Suecia		ELISA	695	3.3	ND	Lundén <i>et al.</i> , 2002
Taiwan		LAT	111	28.8	32	Fan <i>et al.</i> , 2004
		LAT	395	10.1	32	Tsai <i>et al.</i> , 2007
Venezuela						
	Estado					
	Aragua	HAI	425	9.41	64	Romero <i>et al.</i> , 2007
Vietnam		MAT	587	27.2	25	Huong y Dubey, 2007
Zimbabue		IFI	238	19.7	50	Hove <i>et al.</i> , 2005

\* Adaptado de Dubey (2009)

\*\* **ND:** No Determinado, **ELISA:** Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas, **MAT:** Técnica de Aglutinación Modificada, **IFI:** Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta, **HAI:** Técnica de Hemaglutinación Indirecta, **LAT:** Técnica de Aglutinación en Látex, **WB:** Western Blot, **DT:** Dye Test.

En el Cuadro 2 se detalla la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en porcinos salvajes, principalmente jabalíes, donde las frecuencias estan influenciadas por las diferentes pruebas serológicas, edades variables y caza intensiva (Antolová *et al.*, 2007; Dubey, 2009).

**Cuadro 2.** Seroprevalencia mundial de *Toxoplasma gondii* en porcinos silvestres

País	Región	Test	N	%	Punto de corte	Referencia
Brasil		MAT	306	4.5	16	Fornazari <i>et al.</i> , 2009
Eslovaquia		ELISA	320	8.1	ND	Antolová <i>et al.</i> , 2007
España		MAT	507	38.4	25	Gauss <i>et al.</i> , 2005
Japón						
	Kukamoto	LAT	90	4.4	64	Shiibashi <i>et al.</i> , 2004
República						
Checa		IFI	565	26.2	40	Bártolová <i>et al.</i> , 2006

\* Adaptado de Dubey (2009)

\*\* **ND:** No Determinado, **ELISA:** Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas, **MAT:** Técnica de Aglutinación Modificada, **IFI:** Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta, **LAT:** Técnica de Aglutinación en Látex.

## 2.7. Patología

Los parásitos son liberados de los quistes tisulares o de los ooquistes por el proceso digestivo en el tracto gastrointestinal del hospedador (Martin-Hernández y García-Izquierdo, 2003). Inmediatamente después de la penetración de *Toxoplasma gondii* en una célula, este se separa del citoplasma celular por medio de una vacuola parasitófora, sintetizada por el protozoo y la célula anfitriona, en cuyo interior los taquizoítos se multiplican por endodiogenia formando pseudoquistes. Cuando el número de taquizoítos alojados en la vacuola parasitófora es muy elevado, la célula se desintegra, permitiendo su liberación al medio extracelular y la invasión de nuevas células (Dubey, 2010).

En la parasitemia, la cual dura una semana, los taquizoítos libres dentro de los macrófagos, linfocitos o neutrófilos son transportados por vía sanguínea o linfática, pudiendo alcanzar todos los tejidos (Dubey, 2010). Penetran en las células gracias a sus

movimientos, unas estructuras llamadas roptrias, a la producción de hialuronidasas y lisozimas donde en algunas ocasiones lo hacen por un procedimiento similar a la fagocitosis (Martin-Hernández y García-Izquierdo, 2003).

En la segunda semana post infección, la multiplicación de taquizoítos disminuye de manera progresiva hasta cesar completamente (Dubey, 2010), formándose algunos quistes tisulares, los cuales permanecen latentes toda la vida del hospedador, a menos que se produzca una inmunodepresión (Martin-Hernández y García-Izquierdo, 2003).

La localización de los quistes se encuentra con preferencia en las células del SNC, coriorretina y músculos (esquelético y miocardio). El cerebro constituye un refugio especial de los quistes, debido al hecho de que está protegido de los anticuerpos por la barrera hemato-encefálica, carece de un sistema linfático y presenta niveles muy bajos de expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Ocasionalmente los quistes pueden romperse y dejar en libertad los bradizoítos; si son muchos los que se rompen, se produce una reactivación de la enfermedad que puede ser localizada o generalizada (Kasper, 1998).

En hembras gestantes, los taquizoítos se multiplican en los cotiledones sin llegar a enquistarse, esto posiblemente debido a que el placentoma es un lugar inmunológicamente deprimido, donde el parásito no es afectado por la respuesta inmune humoral o celular (Dubey, 2010). La transmisión placentaria se realiza directamente a través de los vasos sanguíneos, con inflamación previa del corion o provocando una placentitis con multiplicación en las células sincitiales, posteriormente pasan a la sangre fetal por un mecanismo de pinocitosis. También se admite el paso a través del líquido amniótico por deglución fetal (Petersen *et al.*, 2001). Una vez que *T. gondii* atraviesa la barrera placentaria, las consecuencias dependerán de la capacidad del feto para iniciar una respuesta inmune y de la edad fetal en el momento de la infección (Dubey, 2010).

## **2.8. Inmunología**

En pacientes inmunocompetentes, la infección aguda activa una cascada de respuestas inmunes protectoras. El parásito entra al hospedador a nivel de la mucosa intestinal y evoca la producción de anticuerpos de tipo IgA, lo que constituye más del 80% del total de anticuerpos en mucosa y ha mostrado ser un importante modulador de la protección e indicador de la infección (Remington *et al.*, 2001). Si el parásito evade esta respuesta inmune, se activan la respuesta inmune humoral y celular (Martín-Hernández y García-Izquierdo, 2003).

### **2.8.1. Respuesta inmune humoral**

Durante la respuesta inmune humoral, *T. gondii* induce rápidamente niveles detectables de anticuerpos de tipo IgA, IgM e IgG en el suero. La IgA se produce durante la fase digestiva del ciclo del parásito, al ser sensibilizados los linfocitos que se encuentran en la lámina propia del tracto intestinal y persiste en la circulación durante 8 a 9 meses, esta inmunoglobulina no atraviesa la barrera placentaria (Hegab y Mutawa, 2003).

La producción específica de anticuerpos IgM es un signo de infección reciente, las evoluciones más frecuentes (>90 % de los casos) involucran: una rápida elevación de los títulos de IgM aparece en el líquido peritoneal a los 2 días y en suero en la primera semana post-infección (Filisetti y Candolfi, 2004), que desaparecen después de varios meses.

La presencia de IgM en la circulación sanguínea de los neonatos es de origen fetal, y sirve en el diagnóstico de infección congénita, debido a que esta inmunoglobulina no atraviesa la barrera placentaria (Jenum y Stray-Pedersen, 1998).

Los títulos de IgG ascendentes de 1 a 3 semanas post infección y alcanzan su máximo nivel 3 a 6 meses después, superando los 1000 UI/mL, para luego disminuir lentamente y quedar como niveles bajos por el resto de la vida (Martín-Hernández y García-Izquierdo, 2003).



Excepcionalmente puede haber respuestas inmunológicas mayores y más prolongadas con títulos de IgG superiores a 1000 UI/mL durante años, acompañados o no de IgM. En respuestas inmunológicas mínimas, observadas frecuentemente cuando se aplica un tratamiento precoz, los títulos de IgM son variables, con un ascenso lento y de débil amplitud de los niveles de IgG, hasta un máximo de 100 UI/mL (Martín-Hernández y García-Izquierdo, 2003).

Para considerar como primoinfección a las respuestas inmunológicas sin aparición de IgM se toma en cuenta la aparición y aumento de los títulos de IgG durante dos o tres meses (Jenum y Stray-Pedersen, 1998).

Se ha demostrado experimentalmente que la depleción de las células B mediante la administración de anti- $\mu$  anticuerpos en ratones infectados con *T. gondii* produce mortalidad asociada con neumonía, miocarditis y/o encefalitis. Esto sugiere que la producción de anticuerpos por las células B puede ser importante para controlar la infección. De manera similar se observó que un grupo de ratones deficientes en células B fueron más susceptibles a la infección por *T. gondii* en comparación con el grupo control (Kang *et al.*, 2000).

Los cerdos inoculados con taquizoítos de *T. gondii* de manera intravenosa desarrollan anticuerpos IgM 8-10 días e IgG 10-17 días post-infección (Lind *et al.*, 1997; Jungersen *et al.*, 1999). Mientras que después de la ingestión de 1 o 10 ooquistes desarrollan anticuerpos 3 semanas post-infección detectados mediante el Test de Aglutinación Modificada (MAT); sin embargo, la seroconversión medida por las técnicas de Hemaglutinación Indirecta (HAI) y Aglutinación en Látex los títulos se mantuvieron bajos (Dubey *et al.*, 1996).

Por otra parte, los cerdos infectados experimentalmente con taquizoítos, quistes tisulares u ooquistes esporulados desarrollan anticuerpos IgG específicos detectados a partir de los 10 a 14 días, alcanzando valores máximos de 3 a 6 semanas y persistiendo durante 3 a 4 meses mediante 4 modelos de ELISA (Elisa indirecta IgM, Elisa indirecta IgG, Elisa sandwich de bloqueo anti-P<sub>30</sub> y Elisa sandwich reverso), IgM apareció rápidamente pero desapareció a las 2 semanas; sin embargo presentan reacción cruzada con diferentes

patógenos: *Ascaris suum*, *Trichinella spiralis*, *Isospora suis*, *Salmonella* spp., *Yersinia* sp. y *Actinobacillus* spp. a excepción de *Sarcocystis miescheriana* (Lind *et al.*, 1997).

Dubey y Urban (1990) reportaron la transmisión transplacentaria de *T. gondii* hallando anticuerpos en los fluidos corporales y suero fetal y detectando al protozoario por histopatología; sin embargo, no evidenciaron la transmisión de anticuerpos a través de la placenta debido a que el cerdo presenta una placenta epiteliocorial y aquellos procedentes del calostro persistían durante 3 meses.

### **2.8.2. Respuesta inmune celular**

El desarrollo de una fuerte respuesta inmune celular es esencial para minimizar los niveles de replicación parasitaria y daño tisular. En la ausencia de esta respuesta, la continua citólisis de células infectadas puede conducir a severas patologías. Esto es mejor ilustrado en individuos con defectos en la función de células T, en los que hay un gran riesgo de desarrollar toxoplasmosis clínica debido a una replicación descontrolada del protozoario (Shapira *et al.*, 2004).

Los granulocitos son las primeras células fagocíticas reclutadas al sitio de infección. Recientemente Dunay *et al* (2010) examinaron la función de los granulocitos en la protección contra la infección de *T. gondii* usando anticuerpos monoclonales específicos para cualquiera de los granulocitos o para agotar los granulocitos y monocitos inflamatorios observando un papel crítico para los monocitos inflamatorios, pero no para los granulocitos en la fase aguda de la infección.

La interacción entre el parásito y las células presentadoras de antígeno es clave para la generación de una respuesta inmune celular, el proceso invasión del parásito implica la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y otras moléculas de fase aguda, así como defensinas, y reguladores de moléculas de superficie celular (Buzoni-Gatel *et al.*, 2006).

Las células dendríticas producen IL-12 en respuesta a *T. gondii* y son importantes para la resistencia contra la infección (Scott y Hunter, 2002). El agotamiento de estas, suprime la producción de IL-12 y aumenta la susceptibilidad a la infección aguda, mientras que la transferencia en ratones antes de la infección restaura la producción IL-12 e IFN- $\gamma$  y aumenta la resistencia a infección (Liu *et al*, 2006).

Las células NK producen IFN- $\gamma$  capaces de eliminar las células infectadas, su citotoxicidad está regulada por la IL-18 a partir de macrófagos y células dendríticas, y aumenta su proliferación a través de las acciones de IL-18 e IL-15 (French *et al.*, 2006). Las células NK migran a los tejidos linfoides en el sitio de la infección donde liberan IFN- $\gamma$  para activar macrófagos y aumentar el MHC II (Khan *et al.*, 2006).

Las células CD4+ y CD8+ específicos de *T. gondii* contribuyen a la defensa del hospedero a través de la producción de IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 (Langermans, *et al.*, 1992). Las células T CD4 + liberan IL-2, que estimula la proliferación de células T CD8 +, estudios inmunogénicos también señalan la influencia de MHC de tipo I y II sobre la resistencia y la susceptibilidad al parásito (Brown *et al.*, 1995).

### **2.8.3. Respuesta inmune de *Toxoplasma gondii***

Frente a la respuesta inmune que genera el hospedador, *T. gondii* induce mecanismos de regulación desencadenando la producción de citocinas anti-inflamatorias, incluyendo IL-10 y TGF- $\beta$  (Gazzinelli *et al.*, 1996), que inhibe la producción de IFN- $\gamma$  (Khan *et al.*, 1995) e impide la activación de macrófagos (Langermans *et al.*, 2001). La IL-10 y la TGF- $\beta$  inhiben la actividad de las células NK (Fiorentino *et al.*, 1991) y la producción de IFN- $\gamma$  respectivamente (Hunter *et al.*, 1995).

Recientemente, Oldenhove *et al* (2009) investigaron el destino de las células T reguladoras durante la infección por *T. gondii*, donde la alta respuesta inmune mucosal de células Th1 polarizadas se asociaron con una disminución de células T reguladoras (Treg) a través de diferentes mecanismos, incluyendo el bloqueo de la inducción de células Treg y la alteración de la homeostasis de la endogénesis. En particular el cierre de la producción de IL-2 contribuye a la incapacidad de las células Treg de suprimir las respuestas efectoras y eventualmente desarrollar la inmunopatogénesis.

*Toxoplasma gondii* es capaz de estimular la producción de Lipoxina A (LXA<sub>4</sub>), un eicosanoide que puede inhibir la producción de IL-12 por las células dendríticas (Aliberti, *et al.*, 2002). Además, interfiere con la expresión de MHC clase I, MHC clase II y la inducción de IFN- $\gamma$  en la superficie celular de macrófagos (Luder y Seeber, 2001).

Es importante mencionar que la inhibición de la expresión de MHC clase II por las células presentadoras de antígeno influye en la activación y proliferación de células T CD4<sup>+</sup>. Esto demuestra que las células T CD4<sup>+</sup> son menos eficaces en la restricción de la diseminación del parásito que las células T CD8<sup>+</sup> (Suzuki *et al.*, 1988).

## **2.9. Signos Clínicos**

La toxoplasmosis clínica en el cerdo es poco común, sin embargo, puede causar partos prematuros y neumonía, se han reportado casos inusuales de miocarditis y encefalitis (Dubey y Jones, 2008). El aborto inducido por la toxoplasmosis ocurre en hembras de todas las edades, que adquieren la infección durante el embarazo (Dubey *et al.*, 1998).

Por otro lado, Kumagai *et al* (1988) reportaron toxoplasmosis neonatal en siete lechones, donde cuatro de ellos nacieron muertos y los demás presentaron alteraciones en la marcha y muerte antes de los 15 días de edad. También se reportan signos como fiebre, disnea y debilidad en las extremidades (Weissenbock y Dubey, 1993).

La toxoplasmosis congénita es rara en porcinos (Dubey, 2010), y depende de la cepa del parásito, vía de infección, raza y etapa de gestación de la marrana (Dubey y Beattie, 1988), un caso de toxoplasmosis congénita fue descrito por Haritani *et al* (1988) en cuatro lechones nacidos muertos que presentaron neumonía y necrosis hepática.

Recientemente, Kim *et al* (2009) reportó la toxoplasmosis clínica en cerdas adultas que presentaron síndrome febril, anorexia, signos neurológicos y pocos abortos, donde hallaron *T. gondii* en tejidos de los fetos abortados.

La mayoría de las infecciones son subclínicas y cuentan con signos no patognomónicos como hipertermia, anorexia, taquipnea (Anyarat *et al.*, 2006; Poljak *et al.*, 2008), en animales de buenas condiciones.

## **2.10. Diagnóstico**

El diagnóstico de la toxoplasmosis se realiza mediante métodos biológicos, serológicos, histológicos, o por la combinación de estos, mientras que el diagnóstico clínico es difícil de establecer ya que los signos clínicos son diversos, inespecíficos y en muchos casos están ausentes. (Dubey, 2010).

### **2.10.1. Diagnóstico serológico**

#### **▪ Prueba de Sabin y Feldman o Dye Test (RSF)**

La reacción de Sabin y Feldman mide preferentemente anticuerpos de tipo IgG, (Borbolla *et al.*, 2005; Ovalle *et al.*, 2000). En esta prueba, los taquizoítos vivos se incuban con el complemento, el suero de prueba y un colorante fuertemente alcalino de azul de metileno (pH: 11) a 37° C durante 1 hora (Dubey, 2010). La técnica se fundamenta en la lisis y destrucción de la membrana citoplasmática de los taquizoítos producida por los anticuerpos y mediada por el complemento, como resultado de ello los taquizoítos afectados no incorporan el azul de metileno y aparecen incoloros, por otra parte, en la reacción negativa, los taquizoítos vivos toman activamente el color azul del reactivo (Dubey, 2010; Kijlstra *et al.*, 2004). Esta prueba serológica es altamente sensible (99%) y específica (100%) (Ovalle *et al.*, 2000); sin embargo, ha sido reemplazado por otras técnicas nuevas debido a sus altos costos, dificultad de manipulación y el peligro potencial que representapor la utilización de organismos vivos (Borbolla *et al.*, 2005; Dubey, 2010).

#### **▪ Hemaglutinación Indirecta (HAI)**

La técnica de hemaglutinación indirecta es una prueba serológica utilizada rutinariamente en muchos laboratorios, teniendo una sensibilidad de 29.4% y una especificidad de 98.3% demostrada en porcinos (Dubey *et al.*, 1995). Detecta anticuerpos IgG y se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* de producir aglutinación en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con antígenos citoplasmáticos y de membrana del parásito, el empleo de ambos tipos de antígenos incrementa la sensibilidad del método permitiendo la detección precoz de la infección, en

ese sentido tanto la presencia de anticuerpos heterófilos como la aparición de IgM, características del período agudo de la parasitosis, se investigan empleando tratamiento con 2-Mercaptoetanol (2-ME) y eritrocitos no sensibilizados para el control y absorción de heterofilia (Wiener Lab, 2000).

La técnica de hemaglutinación indirecta (HAI) no es muy específica, ya que presenta reacciones cruzadas con otros parásitos (Blood y Radostits, 1992), y su principal limitación es que no detecta anticuerpos en etapas tempranas, pues se alcanzan títulos diagnósticos a los 30 días de la infección (Rojas, 1990), aunque es una de las más usadas comercialmente (Soulsby, 1987). Asimismo, la prueba puede no ser capaz de detectar anticuerpos en un cerdo individual, pero es muy útil como referencia para determinar la exposición en un hato (Montoya *et al.*, 1996).

- ***Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)***

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) posee una alta sensibilidad (99%) y especificidad (100%) (Ovalle *et al.*, 2000). La prueba se fundamenta en la detección de anticuerpos IgG utilizando taquizoítos muertos y fijados en láminas portaobjetos con áreas circulares, adicionando anticuerpos IgG humanos marcados con isotiocianato de fluoresceína, la lectura se puede facilitar mediante una coloración de contraste de azul de Evans (Dubey, 2010; Martín-Hernández y García-Izquierdo, 2003). La reacción se lee al microscopio de fluorescencia y la dilución más alta, en la cual se observa fluorescencia verde amarillenta en toda la periferia de los taquizoítos, se considera una reacción positiva a dicha dilución. Se considera reacción negativa cuando el parásito se observa completamente rojo o si la fluorescencia se ve localizada en uno de los extremos de los parásitos, lo que se llama fluorescencia polar (Dominges *et al.*, 1998). Este fenómeno se debe a la unión de anticuerpo IgM de *T. gondii* o reacción cruzada con IgG de otros parásitos hemoflagelados: *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania donovani* (Demonts y Remington, 1980; Franco *et al.*, 1980).

- ***Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)***

La prueba de ELISA detecta anticuerpos IgG para el diagnóstico de infecciones activas (Shaapan *et al.*, 2008; Hosseini *et al.*, 2009), se fundamenta en la reacción antígeno-anticuerpo reforzada por la adición de un complejo antígeno-anticuerpo ligado a una enzima (conjugado) que actuará sobre un sustrato obteniendo una coloración cuantificable por espectrofotometría (Dubey, 2010). Los kits comerciales de ELISA utilizan micropocillos, que contienen en el fondo un antígeno basado en taquizoítos de *T. gondii* fijados en formalina (Gamble *et al.*, 2005).

La prueba posee una sensibilidad de 90.1% y una especificidad de 85.9% demostrada en ovinos (Shaapan *et al.*, 2008). Actualmente existe variación de acuerdo con el tipo de técnica y kits utilizados. García *et al.* (2006) estudiaron un ELISA indirecto utilizando Roptrias crudas de *T. gondii* como antígeno, hallando una sensibilidad de 94.3% y especificidad de 100% en porcinos infectados experimentalmente. Posteriormente, Basso *et al.* (2014) determinó una sensibilidad de 98.9% y una especificidad de 92.7% utilizando un kit comercial para la especie porcina. Asimismo, Steinparzer *et al.* (2014) comparó tres kits comerciales de ELISA en sueros de porcinos obteniendo sensibilidad de 57.3 a 65.2% y especificidad de 97.4 a 99.4%.

**Cuadro 3.** Pruebas ELISA desarrolladas para el diagnóstico de infección por *Toxoplasma gondii* en porcinos

Tipo de ELISA (Antígeno)	Punto de Corte	Características Diagnósticas		Técnica de Comparación	Referencia
		Se*	Esp*		
Indirecto (Taquizoíto RH)	DO>0.36	94.0	92.0	DT	Lundén <i>et al.</i> , 2002
Indirecto (Taquizoíto crudo)	-	71.5	85.5	Aislamiento de <i>T. gondii</i> en felinos y ratones	Georgiadis <i>et al.</i> , 2003
Indirecto (Taquizoíto crudos)	-	88.6	98.0	Aislamiento de <i>T. gondii</i> en felinos	Gamble <i>et al.</i> , 2005
r-ELISA (Roptrias crudas)	DO≥0.30	94.3	100.0	IFI	García <i>et al.</i> , 2006

Indirecto (Taquizoíto crudo)	-	100.0	-	Aislamiento de <i>T. gondii</i> en felinos	Hill <i>et al.</i> , 2006
Indirecto (Taquizoíto crudo)	PP $\geq$ 15%	98.9	92.7	IFI Western blot	Basso <i>et al.</i> , 2013
TgSAG1-ELISA (Taquizoíto P30)	-	93.1	98.8	IFI Western blot	Basso <i>et al.</i> , 2013
Indirecto (Taquizoíto crudo)	-	57.3	99.4	MAT	Steinparzer <i>et al.</i> , 2014
Indirecto (Taquizoíto crudo)	-	57.3	98.9	MAT	Steinparzer <i>et al.</i> , 2014

**\*Se:** Sensibilidad, **\*Esp:** Especificidad, **DT:** Dye Test., **ELISA:** Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas, **MAT:** Técnica de Aglutinación Modificada, **IFI:** Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta

La técnica de ELISA ha mostrado claras ventajas sobre otras pruebas. Se pueden analizar mayor cantidad de muestras en forma simultánea con poco equipo sofisticado, comparado con la prueba de inmunofluorescencia, y los resultados obtenidos ofrecen mayor consistencia y confiabilidad que las obtenidas con la hemaglutinación indirecta (Waltman *et al.*, 1984). Además, puede detectar tanto infecciones recientes como latentes de toxoplasmosis, detectando simultáneamente anticuerpos IgM e IgG (Romero *et al.*, 1995).

#### ▪ ***Técnica de Aglutinación Modificada (MAT)***

La técnica de aglutinación modificada fue descrita inicialmente por Fulton y Turk en 1959 y mejorada por Dubey y Desmonts en 1987 (Dubey, 2010), utiliza taquizoítos inactivados con formalina y un tampón de coloración, no requiere reactivos específicos para cada especie (Shaapan *et al.*, 2008; Macri *et al.*, 2009). Los sueros son tratados con 2-mercaptoetanol para eliminar IgM específicas y no específicas, utilizando dos o más diluciones. Las reacciones positivas muestran una sedimentación en forma de velo cuyas características morfológicas pueden diferir de un suero a otro: velo homogéneo, granuloso o de bordes replegados, mientras que una reacción negativa se traduce en la formación de un botón de sedimentación redondo, de bordes netos (Martín-Hernández y García-



Izquierdo, 2003). Esta prueba sólo detecta anticuerpos IgG; por lo tanto, puede dar resultados falsos negativos durante las primeras etapas de la infección aguda (Dubey, 1997). Posee una sensibilidad de 96% y especificidad de 88.9% (Shaapan *et al.*, 2008).

- ***Técnica de Inmunotransferencia o Inmunoblot (WB)***

Inmunoblot ha sido establecido como una prueba confirmatoria para el diagnóstico de *Toxoplasma gondii*, principalmente en infecciones congénitas (Frank *et al.*, 2008). Los sueros reaccionan con antígenos específicos de *T. gondii* y son transferidos a membranas de un gel de poliacrilamida, los resultados se representan en bandas y son comparados con patrones mediante peso molecular (Gross *et al.*, 2000). Por lo general se procesan los sueros del neonato y la madre para determinar si el anticuerpo IgG en el lactante es el resultado de una infección activa o transferencia pasiva de la madre (Remington *et al.*, 2004). La técnica posee una sensibilidad de 82.6% y una especificidad de 96.1% validada en humanos (Tissot *et al.*, 2003). Así como una sensibilidad y especificidad de 93.5 y 77.2% demostrada en cerdos infectados experimentalmente (Basso *et al.*, 2013). Esta técnica ha sido aplicada en investigaciones veterinarias tales como las realizadas por Suarez-Aranda *et al* (2000), Saavedra y Ortega (2004) y Kijlstra *et al* (2004) que analizaron sueros de porcinos.

### ***2.10.2. Diagnóstico no serológico***

- ***Aislamiento del parásito***

El aislamiento de *Toxoplasma gondii* en cultivos celulares o en animales de experimentación supone un diagnóstico específico, pero la sensibilidad varía mucho según las condiciones de la muestra (estado de conservación, carga parasitaria, virulencia de la cepa implicada), los resultados en los cultivos celulares son más rápidos que en animales de experimentación, aunque en éstos últimos se ha observado una mayor sensibilidad. Para que los resultados sean óptimos las muestras deben mantenerse frescas, libres de contaminación y no deben congelarse en ningún momento puesto que se genera la muerte del parásito (Buxton y Maley, 2004). Las muestras que se analizan son líquido

cefalorraquídeo, sangre heparinizada, y tejidos con infección aguda previamente homogenizados (Dubey, 2010).

#### ▪ ***Examen microscópico***

El diagnóstico citológico se puede realizar mediante un frotis de impresión del área lesionada, luego de secar el frotis durante 10-30 minutos se fija en metanol y se somete a tinción de Giemsa, finalmente se observa al microscopio los taquizoítos con forma de media luna (Hill y Dubey, 2002). Para el diagnóstico histopatológico las muestras remitidas son: cerebro, lengua, masetero, diafragma y corazón; que se fijan en formol al 10%, se someten a reducción y tinción con hematoxilina-eosina (García *et al.*, 2006). Los taquizoítos aparecen generalmente redondos u ovalados en el interior de una vacuola parasitófora, los quistes tisulares son esféricos, carecen de tabique y se pueden teñir con tinción de plata, además son positivos a la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS), la microscopia electrónica puede ayudar en el diagnóstico (Hill y Dubey, 2002).

#### ▪ ***Inmunohistoquímica (IHQ)***

La Inmunohistoquímica utiliza anticuerpos para detectar antígenos específicos de *T. gondii* en cortes de tejidos observados al microscopio (Chen *et al.*, 2000). Los tejidos son fijados en formol al 10% durante 24 horas, cortes de 4-5µm de espesor son deshidratados en etanol e incluidos en parafina, posteriormente se colocan en laminillas cubiertas con poli-L-lisina. El uso del anticuerpo primario está limitado a diferentes protocolos, de acuerdo al protocolo citado por Méndez *et al* (2011) se puede utilizar un antisuero hiperinmune caprino anti-*T. gondii*, o anticuerpos policlonales de conejo anti-*T. gondii* para magnificar la reacción inmunológica se utiliza el complejo avidina-biotina-peroxidasa (CAB) con la finalidad de identificar estructuras con inmunopositividad a *T. gondii*. Méndez *et al* (2011) reportaron hallazgos en pulmón, hígado y cerebro de monos ardilla (*Saimiri sciureus*), donde observaron estructuras con inmunopositividad a *Toxoplasma gondii* en el interior de macrófagos alveolares, citoplasma de los hepatocitos y neutrófilos.

- ***Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)***

La detección directa del ADN del parásito se basa en la técnica de la Reacción en Cadena de polimerasa (PCR), en esta, un fragmento específico del genoma es amplificado para que sea visualizado en un gel de electroforesis, en un secuenciador automatico o en un software de PCR en tiempo real (Switaj *et al.*, 2005). Esta técnica se ha utilizado para la detección de la toxoplasmosis en pacientes inmunocomprometidos, infecciones congénitas y toxoplasmosis ocular (Remington *et al.*, 2004). Las muestras remitidas son: líquido amniótico, sangre, líquido cefalorraquídeo, fluido vitreo, orina, lavado broncoalveolar o diferentes tejidos (Robert-Gangneux y Laure, 2012). La sensibilidad y especificidad dependerán principalmente de la técnica apropiada de extracción del material genético, procesamiento, características de la secuencia escogida y los parámetros de la reacción de amplificación (Switaj *et al.*, 2005). La especificidad de esta prueba es de 100%, mientras que la sensibilidad depende de la extracción del ADN y la cantidad de muestra (Alfonso *et al.*, 2009).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.Lugar y Tiempo**

El presente estudio se realizó en 7 granjas porcinas tecnificadas y 10 no tecnificadas, procedentes de los distritos de Huacho, Huaral, Ventanilla, Villa El Salvador, Lurin y Chilca, ubicados en la franja costera del departamento de Lima, a 12°02'37.56" de latitud sur, 77°02'22.55" de longitud oeste y a 50 m.s.n.m., durante los meses de enero a marzo del 2015. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Sección Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ubicada en el distrito de San Borja, Lima.

#### **3.2.Animales en estudio**

Los porcinos en estudio fueron animales de ambos sexos en la etapa de acabado, 264 cerdos entre 90 a 120Kg de peso vivo y 5 meses de edad procedentes de granjas tecnificadas, así como 143 porcinos entre de 60 a 90Kg de peso vivo y 7 meses de edad procedentes de criaderos no tecnificados.

#### **3.3.Tamaño muestral**

El tamaño muestral se determinó mediante la fórmula de proporción de poblaciones finitas con 95% de confianza y 5% de precisión (Daniel, 1996). Se utilizó como población porcina en Lima-Perú 388'793 animales (INEI, 2013) y como prevalencia referencial 32.3% (Suárez-Aranda *et al.*, 2000). Siendo evaluadas 407 muestras.

#### **3.4.Toma de muestras**

Previo Consentimiento Informado (Anexo 1). Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos de boca ancha sin anticoagulante al momento del sacrificio, durante el proceso de degüello, posteriormente transportados al Laboratorio de Parasitología (FMV-

UNMSM) donde se obtuvieron los sueros por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos conservándose en viales a -20°C hasta su procesamiento y análisis serológico.

### **3.5.Laboratorio**

#### **3.5.1. Materiales y equipos**

- **Reactivos para Elisa indirecto:** Tampón de dilución, solución de lavado, tampón para diluir conjugado, concentrado de conjugado, solución sustrato TMB, solución de frenado, agua desionizada, sueros controles positivos y negativos para *Toxoplasma gondii*.
- **Reactivos para HAI:** Tampón de dilución, control positivo, sueros controles positivo y negativo, antígeno (globulos rojos sensibilizados), globulos rojos no sensibilizados.
- **Materiales:** Tubos vacutainer, guantes, caja térmica, geles refrigerantes, plumones, crioviales materiales de limpieza y desinfección, vaso de precipitado, probeta, matraz Erlenmeyer, cápsula de magneto, placas sin tapizar con fondo plano de 96 pocillos, placa sin tapizar con fondo en U de 96 pocillos, tips (10, 200 y 1000µL), cajas de tips, micropipetas monocanal y multicanal, papel parafina, tijera, papel toalla, cinta adhesiva, reservorios multicanal.
- **Equipos:** Ultracongeladora, centrifuga, homogenizador, agitador vórtex, incubadora, lector de microplacas.

#### **3.5.2. Determinación de anticuerpos contra *T. gondii***

- **Técnica de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA indirecta)**

Se utilizó un «kit» comercial (PrioCHECK Toxoplasma Ab porcine, Prionics Ag, Zurich, Suiza), que posee una sensibilidad del 98.9% y una especificidad del 92.7% (Basso *et al.*, 2013), se siguieron las instrucciones de acuerdo con el protocolo del fabricante (Anexo 2). La lectura de la absorbancia se realizó en un lector automático de

ELISA con filtro de 450 nm. Para la interpretación de los resultados se calculó el Porcentaje de Positividad (PP%) y fueron considerados positivos cocientes iguales o mayores a 20%.

▪ **Técnica de Hemaglutinación Indirecta (HAI)**

Se utilizó un kit comercial (Toxotest) para uso humano, pero muy usado en medicina veterinaria, el cual posee una sensibilidad de 29.4% y una especificidad de 98.3% comprobada en porcinos, aplicándose en otros trabajos de investigación (Díaz *et al.*, 2001; Dabanch, 2003). Se prepararon diluciones de las muestras de 1:16 a 1:2048; considerándose como positivo títulos iguales o mayores 1/64, basados en estudios previos (Romero y Sogbe, 2005; Romero *et al.*, 2007). Se siguieron las instrucciones de acuerdo a lo establecido por el fabricante (Anexo 3).

### 3.6. Análisis de la Información

Con la información obtenida se creó una base de datos, donde fueron adicionados los resultados serológicos con el objeto de interrelacionarlos y validarlos estadística y epidemiológicamente. Se evaluó el grado de concordancia mediante el índice de kappa, considerándose en la interpretación establecida por Landis y Koch (1977): 0: pobre; > 0 - 0.2: leve; 0.21-0.40: regular; 0.41-0.60: moderada; 0.61-0.8: buena; 0.81-1: perfecta. Para luego aplicar la fórmula de Kappa:

$$K = \frac{N(a + d) - (n_1x f_1 + n_2x f_2)}{N^2 - (n_1x f_1 + n_2x f_2)}$$

Así mismo se evaluó si los resultados serológicos fueron mutuamente reemplazables utilizando la prueba de McNemar (González y Falcón, 1999).

$$X_{Mc^2} = \frac{(b - c)^2}{b + c}$$

$X_{Mc} < X_{Mt}$  las pruebas se pueden reemplazar mutuamente

$X_{Mc} > X_{Mt}$  las pruebas no se pueden reemplazar mutuamente

#### IV. RESULTADOS

En la detección de IgG anti toxoplasma porcino mediante dos técnicas se midió la concordancia entre los resultados de las técnicas de Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA indirecto) y Hemaglutinación indirecta (HAI) para ello se utilizó la prueba de Kappa la cual mide el grado de concordancia entre las técnicas evaluadas, y además se empleó la prueba de Mc Nemar para determinar si ambas pruebas son mutuamente reemplazables.

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de los sueros de cerdos hallados mediante las técnicas de ELISA indirecto e HAI y agrupados de acuerdo a su concordancia, donde la prueba de Kappa arroja un valor que indicaba una concordancia regular de 0.26 mientras que la prueba de Mc Nemar no detectó diferencia significativa entre las técnicas ya que el coeficiente calculado fue de 3.28 siendo menor que el de tabla, demostrando que una prueba podría ser reemplazada por la otra. Sin embargo, el índice Kappa al presentar una concordancia regular no se recomienda reemplazar ambas pruebas.

Por otro lado, la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en cerdos de Lima mediante las técnicas de HAI y ELISA indirecto fue de  $18.7 \pm 3.8\%$  y de  $14.7 \pm 3.4\%$  para cada una de las técnicas respectivamente (Cuadro 5).

**Cuadro 4.** Distribución de sueros según los resultados de las técnicas de HAI y ELISA indirecto para la detección de *Toxoplasma gondii* en cerdos procedentes de Lima-Perú,

2015

HAI	ELISA		Total
	+	-	
+	26	50	76
-	34	297	331
<b>Total</b>	60	347	407

K = 26.0%

**Cuadro 5.** Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en cerdos procedentes de Lima-Perú, 2015 mediante las técnicas de Hemaglutinación Indirecta y ELISA indirecto.

Total	HAI		ELISA	
	Positivos	% $\pm$ IC	Positivos	% $\pm$ IC
407	76	18.7 $\pm$ 3.8	60	14.7 $\pm$ 3.4



## V. DISCUSIÓN

El diagnóstico de la infección por *T. gondii* en porcinos usualmente se basa en la detección de anticuerpos específicos, existiendo disponibles en el mercado diferentes kits comerciales (Jiang *et al.*, 2008) y su uso depende mucho de las facilidades de equipos y reactivos con los que cuente el laboratorio, así como costos de los kits; existiendo además diferencias entre la sensibilidad y especificidad que ellas ofrecen (Huerta *et al.*, 2006). Entre las principales técnicas que se utilizan se tienen: Hemaglutinación Indirecta (HAI), el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) y la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (Cortes y Mancera, 2009); así como la Técnica de Aglutinación Modificada (MAT), considerada como referencia para la validación de otras pruebas serológicas (Klun *et al.*, 2006; Sroka *et al.*, 2011), y finalmente la técnica de Sabin-Feldman o Dye Test, conocida como prueba confirmatoria (Reiter-Owona *et al.*, 1999).

La técnica de Sabin-Feldman fue la primera prueba descrita (1948) capaz de detectar anticuerpos específicos (IgM, IgA e IgG), utiliza un punto de corte de 1:4 (Vostalova *et al.*, 2000) y 1:16 (Tamayo *et al.*, 1990); así como puede diferenciar una infección aguda de una crónica, empleando taquizoitos vivos (Reiter-Owona *et al.*, 1999) a un punto de corte 1:1024 (Brook *et al.*, 1987). Debido a la dificultad de manipulación y peligro por la utilización de organismos vivos (Dubey, 2010), fue sustituida por la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (Castaño *et al.*, 1991). La Técnica de IFI diferencia IgM de IgG (Lind *et al.*, 1997) por medio de una anti-IgG humana marcada con isotiocianato de fluoresceína, considerando positivos títulos donde se observa fluorescencia alrededor del taquizoito (Cortes y Mancera, 2009), utiliza puntos de corte de 1:16 (Edelhofer, 1994) y 1:64 (de Moura *et al.*, 2007) y es considerado como una técnica “Gold standard” en la detección de anticuerpos contra *T. gondii* en porcinos infectados experimentalmente (Garcia *et al.*, 2006). Para el diagnóstico de toxoplasmosis porcina cuenta con una sensibilidad de 87.3% y 87.0% (Basso *et al.*, 2013).

Por otra parte, el Test de Aglutinación Modificada (MAT) (Desmonts y Remington 1980), emplea taquizoitos de *T. gondii* completos fijados en formalina, con el

agregado de mercaptoetanol y solución colorante de Azul de Evans, la presencia de anticuerpos séricos produce la aglutinación en suspensión de los parásitos a un punto de corte de 1:25 (Dubey *et al.*, 1992) o 1:64 (Caporali *et al.*, 2005), la ausencia de anticuerpos produce la sedimentación en un “botón azul” (Patitucci *et al.*, 2006)

La técnica de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) es una prueba para la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos IgG contra *T. gondii* (Romero *et al.*, 1995). Se encuentra bajo la presentación de kits comerciales, utilizando diferente antígeno y puntos de corte (Dubey, 2009) así como sensibilidad (57.3-65.2%) y especificidad (97.4-99.4%) (Basso *et al.*, 2013; Steinparzer *et al.*, 2014).

La técnica de HAI, emplea glóbulos rojos de carnero sensibilizados (Balfour *et al.*, 1982), con antígenos citoplasmáticos y de superficie del parásito para detectar anticuerpos totales (IgG e IgM), incrementando la sensibilidad de la prueba; por lo tanto, permite la detección precoz de la infección (Wiener Lab, 2000). La técnica presenta una sensibilidad de 29.4% y una especificidad de 98.3% (Dubey *et al.*, 1995); y se viene utilizando en clínicas y hospitales veterinarios (Suárez *et al.*, 2002).

Los cuadros 4 y 5 muestran los resultados de seroprevalencia obtenidos con las técnicas de HAI (18.7%) e ELISA indirecta (14.7%), con muestras de sueros de porcinos de Lima-Perú, se puede observar que el coeficiente de concordancia Kappa presentó un valor de 26.0% mostrando una concordancia regular, similar al estudio realizado por Suárez *et al.* (2002) en cerdos que mostró un índice de Kappa de 36.6% donde consideraron al ELISA como prueba de referencia; sin embargo en el presente estudio la prueba de Mc Nemar no demostró significancia, determinando que el ELISA y HAI pueden reemplazarse mutuamente. Sin embargo, el índice Kappa al presentar una concordancia regular nos indica que estas pruebas no son mutuamente reemplazables.

El Cuadro 4 muestra la distribución de sueros donde se observa una mayor cantidad de sueros positivos obtenidos por HAI respecto a ELISA, que se puede explicar al incremento de la sensibilidad atribuida al antígeno (citoplasmáticos y de membrana) así como la presentación del kit de uso multiespecie (Wiener Lab, 2000). Caso contrario

observado en el ELISA, el cual se realizó mediante un kit elaborado únicamente para porcinos (Basso *et al.*, 2013).

Las técnicas de HAI y ELISA han venido siendo comparadas en diferentes especies y agentes infecciosos; así, en caninos se compararon las técnicas de ELISA, IFI y HAI para el diagnóstico de *T. gondii*, hallándose prevalencias de 35.0, 35.0 y 22.5% respectivamente; se halló también una alta correlación entre IFI y ELISA (81.0%) y moderada entre ELISA y HAI (69.0%), donde concluye que un resultado negativo en HAI no debe excluir una posible infección (Silva *et al.*, 1981). En otro estudio realizado en Brasil se determinó la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en cabras; mediante las pruebas de HAI y ELISA, donde se hallaron valores de 19 y 19.5% respectivamente; hallándose una alta concordancia (Figueiredo *et al.*, 2001). Sin embargo, en otro reporte para el diagnóstico de toxoplasmosis porcina se ha comparado los resultados de HAI y ELISA donde se obtuvo una correlación pobre (Hirvela-Koshi, 1990; Dubey *et al.*, 1995), similar al hallado en el presente estudio.

La técnica de HAI posee ciertas ventajas respecto al ELISA, en principio es una prueba simple, confiable utilizada a nivel mundial, dado que posee la facilidad de evaluar cada muestra de forma independiente con pequeña cantidad de suero (Beaver *et al.*, 1984; Suárez *et al.*, 2002), además se puede detectar el título de anticuerpo tomando la mayor dilución en la cual se observa hemaglutinación franca, utilizando punto de corte de 1:16 (Triolo-Mieses y Traviezo-Valles, 2006) y 1:64 (Romero *et al.*, 1995; Zou *et al.*, 2009). La presencia de anticuerpos heterófilos (autoanticuerpos) como la aparición de IgM (fase aguda) se buscan empleando tratamiento con 2-mercaptoetanol (2ME) y eritrocitos no sensibilizados, estos anticuerpos son absorbidos con eritrocitos no sensibilizados que nos sugiere la presencia de un agente antigenicamente similar a *T. gondii* como *Neospora caninum* o *Sarcocystis* sp. (Ferreira *et al.*, 2014); mientras que en los sueros de pacientes con infección aguda (IgM) tratados con 2-ME, se observa una caída del título en por lo menos dos diluciones comparados con los mismos sueros sin tratar con 2-ME (Wiener Lab, 2000).

La técnica de ELISA por su parte presenta ventajas respecto al HAI, como un diagnóstico rápido, así como las diferentes presentaciones de kits comerciales que

permiten determinar IgM e IgG independientemente, el cual es eficaz para realizar monitoreos de rutina en un hato porcino (Handman *et al.*, 1980; Kasper *et al.*, 1983). Un estudio realizado por Lind *et al.* (1997) utilizando cuatro modelos de ELISA's (Ig-ELISA, IgM-ELISA, ELISA de bloqueo anti-P30 y ELISA reverso IgM) para monitorear el estado inmunológico de una crianza porcina, determinando la presencia de IgM de corta duración (2 semanas) y posteriormente se detectó IgG el cual se mantuvo durante 3-4 meses. Para el caso del presente estudio, la técnica utilizada detectaba IgG debido a que en el estudio realizado por Basso *et al.* (2013) utilizó el mismo kit, detectando anticuerpos en porcinos a las 2 semanas post-infección y se evidenció un incremento de los niveles de anticuerpos a las 11 semanas posteriores.

La técnica de ELISA enfocado en el diagnóstico de toxoplasmosis porcina varía en cuanto a la sensibilidad y especificidad dependiendo del antígeno utilizado, para el IgG-ELISA que posee como antígeno un taquizoito de la cepa RH se halló una sensibilidad de 94% y una especificidad del 92%, mientras que para el ELISA de bloqueo de antígeno anti P30 (membrana), se obtuvo 94% de sensibilidad y 94% de especificidad (Lind *et al.*, 1997). Por otro lado, Gamble *et al.* (2005) utilizó un ELISA comercial de antígeno P30 hallando una sensibilidad de 85.7 a 88.6% y una especificidad de 94.6 a 98.0%. En el estudio de Basso, el kit utilizado en el presente estudio poseía un antígeno a base de taquizoitos fijados donde se determinó una sensibilidad de 88.9% y una especificidad de 92.7% habiéndolo comparado con la técnica de IFI (Basso *et al.*, 2013), y comparándolo solo con la técnica de MAT se obtuvo una sensibilidad de 65.2% y una especificidad de 97.4% (Steinparzer *et al.*, 2014). Recientemente un ELISA comercial que emplea taquizoitos fijados en formalina fue comparado con la técnica de MAT para el diagnóstico de *T. gondii* en porcinos naturalmente infectados, verificando una sensibilidad (88.6%) y especificidad (98.0%) mayor que la de MAT (Gamble *et al.*, 2005).

La técnica de ELISA a su vez presenta ciertas desventajas respecto al HAI, en el presente estudio, el kit determinaba anticuerpos IgG presentes en el suero pero no los niveles, dichos anticuerpos se encuentran en función de la afinidad y concentración, (Venkatesan y Wakelin, 1993), por lo que la técnica ELISA indirecta no proporciona información netamente cuantitativa (Cortes y Mancera, 2009), como si ocurre con la técnica de HAI que brinda titulación en la dilución mas alta (Wiener Lab, 2000).

En el presente trabajo, los resultados obtenidos constituyen un aporte importante para determinar una técnica confiable en el diagnóstico de la toxoplasmosis porcina, considerando las similitudes tanto entre las técnicas de ELISA y MAT como HAI e IFI, y así analizar las técnicas de HAI y ELISA pudieran ser mutuamente reemplazadas, sin embargo, dado el resultado obtenido de una correlación regular, así como la alta especificidad brindada por el kit de ELISA, donde los resultados son más confiables y seguros (Basso *et al.*, 2013; Steinparzer *et al.*, 2014) y tomando como referencia los estudios realizados por Hirvela-Koshi (1990) y Dubey *et al.* (1995) no se recomienda reemplazar ambas pruebas serológicas

## **VI. CONCLUSIONES**

El grado de concordancia en el diagnostico de toxoplamosis porcina entre las pruebas de HAI (18.7%) y ELISA (14.7%) mostraron valores de 26.0% para Indice de Kappa y 3.28 para Mc Nemar, demostrándose estadísticamente que ambas pruebas podrían ser reemplazables, pero como la correlacion fue regular, la concordancia entre ambas pruebas no sería recomendable para que sean mutuamente reemplazables.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda realizar evaluaciones con pruebas específicas para la misma especie y su respectiva estandarización, para determinar el grado de asociación entre ambas pruebas, incluyendo cuadros clínicos para hallar una mejor correlación con anticuerpos.

## VIII. LITERATURA CITADA

1. **Acha P, Szyfres B. 2003.** Zoonosis y Enfermedades Transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2ª ed. Washington: OPS. 413 p.
2. **Afonso E, Lemoine M, Poulle ML, Ravat MC, Romand S, Thulliez P, Villena I, Aubert D, Rabilloud M, Riche B, Gilot-Fromont E. 2008.** Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. Int J Parasitol 38: 1017-1023.
3. **Alfonso Y, Fraga J, Jiménez N, Fonseca C, Dorta-Contreras AJ, Cox R, Capó V, Bandera F, Pomier O, Ginorio D. 2009.** Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis. Exp Parasitol 122: 203-207.
4. **Aliberti J, Serhan C, Sher A. 2002.** Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. J Exp Med 196: 1253-1262.
5. **Alvarado-Esquivel C, García-Machado C, Alvarado-Esquivel D, González-Salazar AM, Briones-Fraire C, Vitela-Corrales J, Villena I, Dubey JP. 2011.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Durango State, Mexico. J Parasitol 97(4): 616-619.
6. **Amato Neto V, Medeiros EAS, Levi GC, Duarte MIS. 1995.** Toxoplasmose. 2ª ed. p.3. Ed. Sarvier, São Paulo.
7. **Antolová D, Reiterová K, Dubinský P. 2007.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*sus scrofa*) in the slovak republic. Ann Agric Environ Med 14: 71-73.



8.     **Anyarat T, Wandee K, Umai B, Teeraphun B, Somsak A. 2006.** Toxoplasmosis in Piglets. Ann NY Acad Sci: 1081: 336-338.
  
9.     **Arko-Mensah J, Bosompem KM, Canacoo EA, Wastling JM, Akanmori BD. 2000.** The seroprevalence of toxoplasmosis in pigs in Ghana. Act Trop. 76: 27-31.
  
10.    **Atías A. 1994.** Parasitología Clínica. 3ª ed. Santiago de Chile: Publicaciones Mediterráneo. 615p.
  
11.    **Azevedo SS, Pena HFJ, Alves CJ, Guimarães AAM, Maksimov P, Schares G, Gennari SM. 2009.** Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from northeastern Brazil. Rev Bras Parasitol 19(2): 80-84.
  
12.    **Azevedo SS, Pena HFJ, Alves CJ, Guimaraes Filho AAM, Oliveira RM, Maksimov P, Schares G, Gennari SM. 2010.** Prevalence anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 19: 1-5.
  
13.    **Balboa J. 2008.** Evaluación serológica del *Toxoplasma gondii* en suinos mediante la prueba de ELISA en plantas faenadoras de la IX y XIV regiones de Chile. Tesis de Médico Veterinario. Valdivia: Univ. Austral de Chile. 25p.
  
14.    **Balfour AH, Fleck DG, Hugues HP, Sharp D. 1982.** Comparative study of three tests (dye test, indirect haemagglutination test, latex agglutination test) for antibodies to *Toxoplasma gondii* in human sera. J Clin Pathol 35: 228-232.
  
15.    **Bártová E, Sedlák K, Literák I. 2006.** Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. Vet Parasitol 142: 150-153.

16. **Bastien P. 2002.** Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 96 Suppl 1: S205-1.
17. **Basso W, Hartnack S, Pardini L, Maksimov P, Koudela B, Venturini MC, Schares G, Sidler X, Lewis F, Deplazes P. 2013.** Assessment of diagnostic accuracy of a commercial ELISA for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in pigs compared with IFAT, TgSAG1-ELISA and Western blot, using a Bayesian latent class approach. *Int J Parasitol* 43 (7): 565-570.
18. **Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. 1984.** *Clinical Parasitology.* 9na ed. Lea and Febiger-Philadelphia. p: 163-166.
19. **Behymer RD, Harlow DR, Behymer DE, Franti C. 1973.** Serologic diagnosis of toxoplasmosis and prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in selected feline, canine and human population. *JAVMA* 162: 959-963
20. **Blood, D.C; O.M. Radostits. 1992.** *Medicina Veterinaria.* 6ª ed. p 1083-1087. Ed. Interamericana. España.
21. **Borbolla M, Izquierdo R, Piña O, Martinez G, Lopez D, Ulan J. 2005.** Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. *Salud Tab* 11(3): 394-399.
22. **Brook RG, McCabe RE, Remington JS. 1987.** Role of serology in diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev. Infect. Dis.* 9:1055-1062.
23. **Brown CR, Hunter CA, Estes RG, Beckmann E, Forman J, David C, Remington J S, McLeod R. 1995.** Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis. *Immunol* 85:419-428.

24. **Bustamante J, Suárez A. 2000.** Estudio comparativo de frecuencias de toxoplasmosis en porcinos procedentes de crianza tecnificada y no tecnificada. Rev Inv Vet Perú 11(1): 32-39.
25. **Buxton D, Maley SW. 2004.** Toxoplasmosis. En: Vallat B, Edwards S. Manual de pruebas de diagnóstico y vacunas para los animales terrestres. p 1202-1209.
26. **Buzoni-Gatel D, Schulthess J, Menard LC, Kasper LH. 2006.** Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. Cell Microbiol 8: 535-544.
27. **Cardona N, Lora F, Gomez J. 2005.** Estandarización del inmunoensayo ELISA para la detección de IgG anti-*Toxoplasma gondii* en ratón Parasitol Latinoam 60:97-101 FLAP. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122005000100019>
28. **Camargo A, Silva A, Marrocos H, Rosenail J, Olivera L, Falcao R. 1998.** Estudo comparativo entre diferentes métodos para diagnóstico da toxoplasmose humana. Newslab 28: 121-128.
29. **Caporali EHG, Silva AV, Mendoça AO, Langoni H. 2005.** Comparação de metodos para determinação da prevalencia de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos dos Estados de Sao Paulo e Pernambuco-Brasil. Arq Cien Vet Zool 8: 19-24
30. **Carletti RT, Freire RL, Shimada MT, Ruffolo BB, Begale LP, Ruiz FM, Navarro IT. 2005.** Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos no Estado do Paraná, Brasil. Ciênc Agr Lond 26(4): 563-568.

31. **Castaño J, Gómez J, Duque A. 1991.** Toxoplasmosis ocular en el Quindío: características clínicas. *Biomédica*. 1:121.
  
32. **Cavalcante GT, Aguiar DM, Chiebao D, Dubey JP, Ruiz VLA, Dias RA, Camargo LMA, Labruna MB, Gennari SM. 2006.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Cats and Pigs From Rural Western Amazon, Brazil. *J Parasitol* 92(4): 863-864.
  
33. **Chandrawathani P, Nurulaini R, Zanin CM, Premaalatha B, Adnan M, Jamnah O, Khor SK, Khadijah S, Lai SZ, Shaik MAB, Seah TC, Zatil SA. 2008.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs, goats, cattle, dogs and cats in peninsular Malaysia. *Trop Biomed* 25: 257-258.
  
34. **Chen M, Aosai F, Mun HS, Norose K, Hata H, Yano A. 2000.** Anti-ASP 70 autoantibody formation by B-1 cells in *Toxoplasma gondii* - infected mice. *Infection and Immunity* 68:4893-4899.
  
35. **Correa R, Cedeño I, de Escobar C, Fuentes I. 2008.** Increased urban seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infecting swine in Panama. *Vet Parasitol* 153: 9-11.
  
36. **Cortes LJ, Mancera L. 2009.** Concordancia entre ELISA e IFI para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *Toxoplasma gondii*. *Revista Infectio* 13 (2): 76-82.
  
37. **Dabanch J. 2003.** Zoonosis. *Rev Chil Infect* 20: 47-51.
  
38. **Damriyasa IM, Bauer C. 2005.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sows in Münsterland, Germany. *Dtsch TierärztlWschr* 112: 223-224.

39. **Damriyasa IM, Bauer C, Edelhofer R, Failing K, Lind P, Petersen E, Schares G, Tenter AM, Volmer R, Zahner H. 2004.** Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. *Vet Parasitol* 126: 271-286.
  
40. **Daniel W. 1996.** Bioestadística: base para el análisis de la ciencia de la salud. 5ª ed. México: Limusa. p 205-207.
  
41. **Desmonts G, Remington JS. 1980.** Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method increasing: sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* 11: 562-568.
  
42. **de Buhr K, Ludewig M, Fehlhaber K. 2008.** *Toxoplasma gondii*-seroprevalence- current results in German swine herds. *Arch Lebensmittelhygiene* 59: 5-8.
  
43. **De Moura AB, Osaki SC, Zulpo DL, Marana ERM. 2007.** Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município do Guarapuava, PR, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 16:54-56.
  
44. **de Sousa S, Ajzenberg D, Canada N, Freire L, Correia da Costa JM, Dardé ML, Thulliez P, Dubey JP. 2006.** Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Vet Parasitol* 135: 133-136.
  
45. **Diaz O, Parra A, Araujo M. 2001.** Seroepidemiología de la toxoplasmosis en una comunidad marginal del municipio Maracaibo, estado Zulia. *Invest Clin* 42: 107-121.
  
46. **Díaz O, Esteves J, García M, Cheng R, Araujo J. 2003.** Seroepidemiología de la Toxoplasmosis en una comunidad indígena Yucpa

de la Sierra de Perijá, Estado Zulia Venezuela. RevMed Chile 131: 1003-1010.

47. **Domingues LM, Machado RZ, Tinucci Costa M, Carvalho CS, Costa AJ, Malheiros EB. 1998.** Canine toxoplasmosis: A comparative evaluation of the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by the indirect immunoenzymatic assay (ELISA) and the indirect immunofluorescence reaction (IIF). Rev Bras Parasitol Vet 7(2): 79-85.
48. **Dubey JP. 1990.** Diagnosis of livestock abortion due to *Toxoplasma gondii*. En: Laboratory diagnosis of livestock abortion. 3a ed. p 168. Iowa State University Press. Ames, USA
49. **Dubey JP. 1994.** Toxoplasmosis. J Am Vet Med Assoc 205: 1593-1598
50. **Dubey JP. 1997.** Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. Vet Parasitol 71: 307-310.
51. **Dubey JP. 2001.** Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. J Parasitol 87: 215-219.
52. **Dubey JP. 2004.** Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. Vet Parasitol 126: 57-72.
53. **Dubey JP. 2006.** Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. Vet Parasitol 140: 69-75.
54. **Dubey JP. 2007.** The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years. J. Eukaryot. Microbiol 55(6): 467-475.

55. **Dubey JP. 2009.** Toxoplasmosis in pigs-The last 20 years. *Vet Parasitol* 164: 89-103.
56. **Dubey JP. 2010.** Toxoplasmosis of animals and humans. 2a ed. Maryland: CRC Press. 336 p.
57. **Dubey JP, Beattie CP. 1988.** Toxoplasmosis of Animals and Man. Boca Raton: CRC Press. p 1-220.
58. **Dubey JP, Urban JF. 1990.** Diagnosis of transplacentally induced toxoplasmosis in pigs. *Am J Vet Res* 51: 1295-1299.
59. **Dubey J, Lappin M. 2000.** Toxoplasmosis y Neosporosis. En: *Enfermedades infecciosas en perros y gatos*. 2ª ed. México: McGraw Hill Interamericana. p 493-503.
60. **Dubey JP, Jones JL. 2008.** *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol* 38: 1257-1278.
61. **Dubey JP, Lappin MR, Thulliez P. 1995.** Long-term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J Parasitol* 81: 887-893.
62. **Dubey JP, Thulliez P, Weigel RM, Andrews CD, Lind P, Powell EC. 1995.** Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *Am J Vet Res* 56(8): 1030-1036.
63. **Dubey JP, Weigel MR, Siegel AM, Thulliez P, Kitron UD, Mitchell MA, Mannelli A, Mateus-Pinilla NE, Shen SK, Kwok OC, Todd SC. 1995.** Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J Parasitol* 81: 723-729.

64. **Dubey JP, Andrews CD, Lind P, Kwok OCH, Thulliez P, Lunney JK. 1996.** Antibody responses measured by various serologic tests in pigs orally inoculated with low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts. Am J Vet Res 57: 1733-1737.
  
65. **Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. 1998.** Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 11(2): 267-299.
  
66. **Dubey JP, Hill DE, Jones, JL, Hightower AW, Kirkland E, Roberts JM, Marcet PL, Lehmann T, Vianna, MCB, Miska K, Sreekumar C, Kwok OCH, Shen SK, Gamble HR. 2005.** Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States; risk assessment to consumers. J Parasitol 91:1082-1093.
  
67. **Dunay IR, Fuchs A, Sibley LD. 2010.** Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. Infect Immun 78: 1564-1570.
  
68. **Fábregas IC, Borges F, da Costa T, Trigueiro R, Santiago CAD, Nicolau JL, Batista L, Riddell P, Gatti L, Reis MR. 2006.** Estudo soroepidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos e frangos, para abate, em região rural do Rio de Janeiro. R Bras Ci. Vet 13(3): 186-189.
  
69. **Fan CK, Su KE, Tsai YJ. 2004.** Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection among slaughtered pigs in northwestern Taiwan. J Parasitol 90: 653-654.
  
70. **Farrell R, Docton F, Chamberlain D, Cole C. 1952.** Toxoplasmosis isolated from swine. Am J Vet Res 13: 181-185.



71. **Fehlhaber K, Hintersdorf P, Krüger G. 2003.** Prävalenz von *Toxoplasma gondii*. Untersuchungen bei Schlachtschweinen aus verschiedenen Haltungsformen und in handelsüblichen Hackfleischproben. Fleischwirtschaft 83: 97-99.
  
72. **Feitosa T, Ribeiro V, Bezerra L, de Almeida J, de Oliveira D, de Moraes D, Rodrigues A, Santos S, de Jesus H. 2014.** *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. Vet Parasitol 202: 305-309.
  
73. **Figueiredo J, Silva D, Cabral D, Mineo J. 2001.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats by the Indirect Haemagglutination, Immunofluorescence and Immunoenzymatic Test in the region of Uberlandia Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 96(5): 687-692.
  
74. **Filisetti D, Candolfi E. 2004.** Immune response to *Toxoplasma gondii*. Ann Ist Super Sanità 40(1): 71-80.
  
75. **Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. 1991.** IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol 147:3815-3822.
  
76. **Fornazari F, Langoni H, Silva RC, Guazzelli A, Ribeiro MG, Chiacchio SB. 2009.** *Toxoplasma gondii* infection in wild boars (*Sus scrofa*) bred in Barazil. Vet Parasitol 164 (2-4): 333-334.
  
77. **Franck J, Garin YJ, Dumon H. 2008.** LDBio-Toxo II immunoglobulin G Western blot confirmatory test for anti-*Toxoplasma* antibody detection. J Clin Microbiol 46: 2334-2338.

78. **Franco EL, Sulzer AJ, Higby RW, Peralta JM. 1980.** Immunoglobulin G and Immunoglobulin M polar staining of *Toxoplasma gondii* in the indirect immunofluorescence test. J Clin Microbiol 12: 780-784.
  
79. **Frenkel JK. 1978.** Toxoplasmosis in cats: diagnosis, treatment and prevention. Comparative immunology and Infectious Diseases 1 (1): 15-20
  
80. **Frenkel JK. 1990.** Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. J Am Vet Med Assoc 196: 233-40.
  
81. **Frenkel JK, Ruiz A, Chinchilla M. 1975.** Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. Am J Trop Med Hyg 24: 439-443.
  
82. **Gamble HR, Dubey JP, Lambillotte DN. 2005.** Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the domestic pig. Vet Parasitol 128: 177-181.
  
83. **Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RC. 1999.** Seroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e caes de propriedades rurais do municipio de Jaguapita, estado do Parana, Barazil. Cien Rural 29: 99-104.
  
84. **Garcia JL, Gennari SM, Machado RZ, Navarro IT. 2006.** *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. Experimental Parasitol 113: 267-271.
  
85. **Garcia JL, Navarro IT, Vidotto O, Gennari SM, Machado RZ, da Luz Pereira AB, Senhorini IL. 2006.** *Toxoplasma gondii*: Comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. Exp Parasitol 113: 100-105.

86. **Garcia JL, Gennari SM, Navarro IT, Machado RZ, Headley SA, Vidotto O, Gimaraes J, Monteiro F, Igarashi M. 2008.** Evaluation of IFA, MAT, ELISAs and immunoblotting for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired serum and aqueous humour samples from experimentally infected pigs. *Res Vet Sci* 84: 237-242.
87. **García-Bocanegra I, Dubey J.P, Simon-Grifé M, Cabezón O, Casal J, Allepuz A, Napp S, Almería S. 2010.** Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pig farms from Catalonia, north-eastern Spain. *Res Vet Sci* 89: 85-87.
88. **Gauss CBL, Dubey JP, Vidal D, Ruiz F, Vicente J, Marco I, Lavin S, Gortazar C, Almería S. 2005.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. *Vet Parasitol* 131: 151-156.
89. **Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. 1991.** Synergistic role of CD41 and CD81 T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 146:286-292.
90. **Gazzinelli RT, Amichay D, Sharton-Kersten T, Grunwald E, Farber JM, Sher A. 1996.** Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol* 219:127-139.
91. **Gebreyes WA, Bahnson PB, Funk JA, McKean J, Patchanee P. 2008.** Seroprevalence of *Trichinella*, *Toxoplasma*, and *Salmonella* in antimicrobial-free and conventional swine production systems. *Foodborne Pathog Dis* 5: 199-203.

92. **Georgiadis MP, Wesley OJ, Gardner IA, Singh R. 2003.** Correlation-adjusted estimation of sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Appl Stat* 52: 63-78.
93. **Gilbert R, Cook A, Dunn D, 2000.** Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: a European multicenter case-control study. *Brit Med J* 312: 142-147.
94. **Goldman M. 1957.** Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein labeled antibody. *J. Exp. Med.* 105: 557-573
95. **Gómez F. 2004.** Estudio sobre la toxoplasmosis en Andorra y el Alto Urgel. Tesis de grado de Doctor. Barcelona: Univ. De Barcelona. 289p.
96. **González A, Falcón N. 1999.** Análisis de datos en Medicina Veterinaria. Púb Tec. FMV. Lima, p 41-59.
97. **Gross U, Luder CGK, Hendgen V, Heeg C, Sauer I, Weidner A, Krczal D, Enders G. 2000.** Comparative immunoglobulin G antibody profiles between mother and child (CGMC test) for early diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J ClinMicrobiol*38: 3619-3622.
98. **Handman E, Goding JW, Remington JS. 1980.** Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 124: 2578-2583.
99. **Hegab SM, Mutawa AI. 2003.** Immunopathogenesis of Toxoplasmosis. *Clin Exp Med* 3: 84-105.
100. **Hill DE, Dubey JP. 2002.** *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 8: 634-640.

101. **Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. 2005.** Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *An Heal Res Rev* 6(1): 41-61.
102. **Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP, Lunney J, Ray Gamble H. 2006.** Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. *Vet Parasitol* 141: 9-17.
103. **Hill DE, Haley C, Wagner B, Gamble HR, Dubey JP. 2009.** Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the U.S. swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring Survey (Swine 2006). *Zoonosis Public Health* 57: 53-59.
104. **Hirvela-Koshi V. 1990.** Evaluation of ELISA for the detection of *Toxoplasma* antibodies in swine sera. *Acta Veterinary Scandinavian* 31:413-422.
105. **Holland GN. 2003.** Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *Am J Ophthalmol* 136: 973-988.
106. **Hosseininejad M, Azizi HR, Hosseini F, Schares G. 2009.** Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG1 for sero-diagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. *Vet Parasitol* 164: 315-319.
107. **Howe DK, Sibley LD. 1995.** *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172:1561-1566.
108. **Hove T, Lind P, Mukaratirwa S. 2005.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs reared under different management systems in Zimbabwe. *Ond J Vet Res* 72: 231-237.

109. **Huerta O, Chávez A, Casas E, Falcán N, Raymundo F. 2006.** Concordancia entre las pruebas de Hemaglutinación Indirecta e Inmunofluorescencia Indirecta para determinar la prevalencia de *Toxoplasma gondii* en ovinos. Rev Inv Vet Perú. 17 (2): 178-183
110. **Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W, Remington JS. 1995.** Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*. Eur J Immunol 25: 994-1000.
111. **Huong LTT, Dubey JP. 2007.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs from Vietnam. J Parasitol 93: 951-952.
112. **INEI. 2013.** IV Censo Nacional Agropecuario. [Internet], [30 de agosto de 2014]. Disponible en: <http://goo.gl/11izO0>.
113. **Inoue I, Leow CS, Husin D, Matsuo K, Darmani P. 2001.** A survey of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs in Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Pub Health 32: 38-40.
114. **Jacobs L, Lunde MN. 1957.** A hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Parasitol. 43: 308-314.
115. **Jenum PA, Stray-Pedersen B. 1998.** Development of specific immunoglobulins G, M and a following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. J Clin Microbiol 36: 2907-2913.
116. **Jiang T, Gong D, Ma L, Nie H, Zhou Y, Yao B, Zhao J. 2008.** Evaluation of a recombinant MIC3 based latex agglutination test for the rapid serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in swines. Vet Parasitol 158:51-56.

117. **Jungersen G, Jensen L, Riber U, Heegaard PMH, Petersen E, Poulsen JSD, Bille-Hansen V, Lind P. 1999.** Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. *Int J Parasitol* 29: 1307-1319.
  
118. **Kang H, Remington JS, Suzuki Y. 2000.** Decreased resistance of B cell – deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 164 (5): 2629-2634.
  
119. **Kasper LH, Crabb JH, Pfefferkorn ER. 1983.** Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J. Immunol.* 130: 2407-2412.
  
120. **Kasper LH. 1998.** *Toxoplasma* infection. En: Harrison's principles of internal medicine. 14<sup>th</sup>ed. New York: McGraw-Hill Companies Inc. p1197-202.
  
121. **Khan A, Taylor S, Su C, Mackey AJ, Boyle J, Glover RD, Tang K, Paulsen IT, Berriman M, Boothrooyd JC, Pfefferkorn ER, Dubey JP, Ajioka JW, Roos DS, Wootton JC, Sibley LD. 2005.** Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res* 33:2980-2992.
  
122. **Khan IA, Matsuura T, Kasper LH. 1995.** IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasite Immunol* 17:185-195.
  
123. **Khan IA, Thomas SY, Moretto MM, Lee FS, Islam SA, Combe C, Schwartzman JD, Luster AD. 2006.** CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathog* 2: 49.

124. **Kijlstra A, Eissen O, Cornelissen J, Munniksmma K, Eijck I, Kortbeek T. 2004.** *Toxoplasma gondii* Infection in Animal-Friendly Pig Production Systems. Invest Ophthalmol Vis Sci 45(9): 3165-3169.
125. **Kijlstra A, Meerburg B, Cornelissen J, De Craeye S, Vereijken P, Jongert E. 2008.** The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. Vet Parasitol 156: 183-190.
126. **Kim JH, Kang KI, Kang WC, Sohn HJ, Jean YH, Park BK, Kim Y, Kim DY. 2009.** Porcine abortion outbreak associated with *Toxoplasma gondii* in Jeju Island, Korea. J Vet Sci 10 (2): 147-151.
127. **Klun I, Djurković-Djaković O., Katić-Radivojević S., Nikolić A. 2006.** Cross sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: Seroprevalence and risk factors. Vet Parasitol 135: 121-131.
128. **Kumagai S, Saga H, Takahashi Y, Shimura O, Hatakeyama N. 1988.** Toxoplasmosis of suckling piglets supposed congenital infection (in Japanese). J Jpn Vet Med41: 251-254.
129. **Landis JR, Koch GG. 1977.** The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics; 33 : 159-79.
130. **Langermans JA, Van der Hulst ME, Nibbering PH, Hiemstra PS, FransenL, Van FurthR. 1992.** IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasma static activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. J Immunol 148:568-574.
131. **Langermans JA, Nibbering PH, Van Vuren-Van Der Hulst ME, Van Furth R. 2001.** Transforming growth factor-beta suppresses interferon-



gamma-induced toxoplasmatatic activity in murine macrophages by inhibition of tumour necrosis factor-alpha production. *Parasite Immunol* 23:169-175.

132. **Leguía G. 2002.** Enfermedades parasitarias de perros y gatos – epidemiología y control. 2ªed. Lima: La Mar. 155p.
133. **Leguía G, Casas E. 1999.** Enfermedades parasitarias y atlas parasitológico de Camélidos Sudamericanos. Lima: La Mar. 190 p.
134. **Lind P, Haugegaard J, Wingstrand A, Henriksen SA. 1997.** The time course of the specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *VetParasitol* 71: 1-15.
135. **Lindsay DS, Blagburn BL, Dubey JP. 2002.** Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. *Vet Parasitol* 103(4): 309-313.
136. **Liu CH, Fan Y, Dias A, Esper L, Corn RA, Bafica A, Machado FS, Aliberti J. 2006.** Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol* 177: 31-35.
137. **López Ch, Díaz J, Gómez J. 2007.** Factores de riesgo en mujeres embarazadas, infectadas por *Toxoplasma gondii* en Armenia – Colombia. *Rev Salud Públ* 7: 180-190.
138. **Luder CG, Seeber F. 2001.** *Toxoplasma gondii* and MHC-restricted antigen presentation: on degradation, transport and modulation. *Int J Parasitol* 31:1355-1369.

139. **Lundén A, Lind P, Engvall EO, Gustavsson K, Uggla A, Vågsholm I. 2002.** Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden. Scand J Infect Dis 34: 362-365.
140. **Luyo C, Pinedo R, Chavez A, Casas E. 2017.** Factores asociados a la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en cerdos de granjas tecnificadas y no tecnificadas de Lima-Perú. Rev Inv Vet Perú 28(1): 141-149.
141. **Macrì G, Sala M, Linder A, Pettirossi N, Scarpulla M. 2009.** Comparison of indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies in dog and cat. Parasitol Res 105: 35-40.
142. **Martín-Hernández I, García-Izquierdo SM. 2003.** Toxoplasmosis en el Hombre. Bioquímica 28(3): 19-27.
143. **Martínez-Fernández AR, Fuentes I, Rodríguez M, Domingo CJ. 1998.** Toxoplasmosis. Medicine 7: 3760-3766.
144. **Méndez A, Martínez I, Saucedo B, Ramirez J. 2011.** Toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla (*Saimiri sciureus*) en cautiverio en Cuernavaca, Morelos, México. Vet Méx 42 (2): 115-123.
145. **Mereiles L. 2001.** Estudo das fontes de Infecção da Toxoplasmose Humana em diferentes localidades do Estado de São Paulo. Tesis de Mestre em Ciências, São Paulo: Univ. de São Paulo. 171p.
146. **Montoya MT, Gómes JE, Castaño JC, Marx C, Aubert D, Bonhomme A, Pinon JM. 1996.** Avances diagnósticos en Toxoplasmosis. [Internet], [12 de enero de 2015]. Disponible: <http://goo.gl/GcBrKz>.

147. **Nicolaus, S.; A. Ravelo. 1937.** Réactions de fixation du complement dans le serum et les extracts d'organes d'animaux atteints de toxoplasmose experimentale. Bull. Soc. Path. Exot. 30: 885-889
  
148. **Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert E, Hall J, Chow D, Dos santos L, O'Brien S, Blank R, Lamb E, Natarajan S, Kastenmayer R, Hunter C, Grigg M, Belkaid Y. 2009.** Decrease of Foxp3<sup>+</sup> Treg Cell Number and Acquisition of Effector Cell Phenotype during Lethal Infect. 31:772-786.
  
149. **Ortega-Mora, L. M. 1997.** Toxoplasmosis y neosporosis. Rev. Ovis. Sep. Madrid, 52: 11-73.
  
150. **Patitucci AN, Pérez MJ, Barril G, Cárcamo CM, Muñoz A. 2006.** Detección de anticuerpos séricos contra *Toxoplasma gondii* (Nicolle y Manceaux, 1909) en llamas (*Lama glama Linneaus*, 1758) y alpacas (*Lama pacos Linneaus*, 1758) de Chile. Arch. med. vet. 38(2): 179-182.
  
151. **Patton S, Faulkner C, Anderson A, Smedley K, Bush E. 2000.** *Toxoplasma gondii* infection in sows and market-weight pigs in the United States and its potential impact on consumer demand for pork. National Pork Board Report NAHMS Swine 1-11.
  
152. **Petersen E, Pollak A, Reiter-Owona I. 2001.** Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. Int J Parasitol 31:115-44.
  
153. **Poljak Z, Dewey CE, Friendship RM, Martin SW, Christensen J, Ojkic D, Wu J, Chow E. 2008.** Pig and herd level prevalence of *Toxoplasma gondii* in Ontario finisher pigs in 2001, 2003, and 2004. Can J Vet Res72: 303-310.
  
154. **Reiter-Owona I, Petersen E, Joynson D, Aspöck H, Dardé ML, Disko R, Dreazen O, Dumon H, Grillo R, Gross U, Hayde M, Holliman R, Ho-**

- Yen DO, Janischke K, Jenum PA, Naser K, Olszeuski M, Thulliez P, Seitz HM. 1999.** The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. World Health Organization 77(11): 929-935.
- 155. Remington JS, McLeod R, Desmonts G. Toxoplasmosis. 2001.** En: Infectious diseases of the fetus and newborn. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders. p 205-346.
- 156. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. 2004.** Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. J Clin Microbiol 42: 941-945.
- 157. Rivera N, Mondragon R. 2010.** Cistogénesis de *Toxoplasma gondii*. Reb 29(1): 13-18.
- 158. Robert Gangneux F, Laure M. 2012.** Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev 25(2):264-296.
- 159. Roberts L, Janovy J. 2009.** Foundation of Parasitology. 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill. 701p.
- 160. Rojas, M. 1990.** Parasitismo de los rumiantes domésticos. p 326-334. Ed. Mijosa. Lima.
- 161. Rojas M. 2003.** Nosoparasitosis de perros y gatos peruanos. Lima: Martegraf. p 44-48.
- 162. Romero J, Sogbe E. 2005.** El cerdo (*Sus scrofa*), fuente de infección de *Toxoplasma gondii* al humano en el Estado Aragua, Venezuela. Malariol Salud Amb 45(2):111-117.

163. **Romero T, Bermúdez M, Dosil P, Montiel M. 1995.** Estudio comparativo entre los métodos de hemaglutinación e inmunoanálisis enzimático en el diagnóstico de la toxoplasmosis. *Kasmera* 23: 69-88
  
164. **Romero J, Sogbe E, Diaz C. 2007.** Estudio Serológico e Histopatológico de la Infección por *Toxoplasma gondii* en Cerdos del estado Aragua-Venezuela. *Rev Fac Cs Vets UCV* 48(2): 85-95.
  
165. **Romero T, Bermudez M, Dosil PG, Mantiel M, Ruíz A. 1995.** Estudio comparativo entre los métodos de hemaglutinación indirecta e inmunoanálisis enzimática en el diagnóstico de la toxoplasmosis. *Kasmera* 23: 69-88.
  
166. **Saavedra GM, Ortega YR. 2004.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in swine from slaughterhouses in Lima, Peru, and Georgia, U.S.A. *J. Parasitol* 90: 902-904.
  
167. **Sabin, AB; Feldman HA. 1948.** Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasited (*Toxoplasma*). *Science* 108: 660-663.
  
168. **Sabin AB, Olitsky PK. 1937.** *Toxoplasma* and obligate intracellualr parasitism. *Sci* 85: 336-338.
  
169. **Santacruz M, Cortés L. 2004.** Manual de toxoplasmosis. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud.
  
170. **Scott P, Hunter CA. 2002.** Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr Opin Immunol* 14: 466-470.
  
171. **Sedlák K, Bártoová E. 2007.** *Toxoplasmóza zvířat* a její laboratorní diagnostika v Ceske republice. *Veterinarstvi* 57: 562-567.

172. **Shaapan RM, El-Nawawi FA, Tawfik MAA. 2008.** Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. Vet Parasitol: 153: 359-362.
173. **Shapira S, Harb OS, Caamano G, Hunter CA. 2004.** The NF-  $\kappa$ B signaling pathway: immune evasion and immunoregulation during toxoplasmosis. Int J Parasitol 34: 393-400.
174. **Shiibashi T, Narasaki K, Yoshida M, Nogami S. 2004.** Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibody in hunter-killed wild boars, *Sus scrofa leucomystax*, on Amakusa Island, Kumamoto Prefecture, Japan. J Vet Med Sci 66: 327-328.
175. **Silva D, Cabral D, Bernardina B, Souza M, Mineo J. 1997.** Detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in dog. A comparative study of immunoenzymatic, immunofluorescent and haemagglutination titres. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 92: 785-789.
176. **Silva N, Chaplin E, Méndez L, Araujo F. 1981.** Determinacao de anticorpos toxoplásmicos em soros de suínos abatidos em matadouros, na regio do Alto Taquari, RS, Brasil. Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 9:33-38.
177. **Sobral CA, Amendoeira MRR, Teva A, Patel BN, Klein CH. 2005.** Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenos Brazilian populations. Am J Trop Med Hyg 72 (1): 37-41.
178. **Soulsby E. 1987.** Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ª ed. p 681-693. Ed. Interamericana. México.

179. **Sroka J, Cencek T, Ziomko I, Karamon J, Zwoliński J. 2008.** Preliminary assessment of ELISA, MAT, and LAT for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs. Bull Vet Inst Pulawy 52: 545-549.
180. **Sroka J, Karamon J, Cencek T, Dutkiewicz J. 2011.** Preliminary assessment of usefulness of cELISA test for screening pig and cattle populations for presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*. Ann Agr. Env Med 18: 335–339.
181. **Steinparzer R, Reisp K, Grünberger B, Köfer J, Schmoll F, Sattler T. 2014.** Comparison of Different Commercial Serological Tests for the Detection of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Serum of Naturally Exposed Pigs. Zoonoses Public Health 62: 119-124.
182. **Suárez F, Andrade H, Galisteo A, Miguel O. 2002.** Concordancia de las pruebas de ELISA y Hemaglutinación indirecta en el diagnóstico de la Toxoplasmaosis porcina. Rev Inv Vet Perú 13(1): 84-86.
183. **Suaréz-Aranda F, Galisteo Jr AJ, Hiramoto RM, Cardoso RPA, Meireles LR, Miguel O, Andrade Jr HF. 2000.** The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. Vet Parasitol 91: 23-32.
184. **Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. 1988.** Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science 240:516-518.
185. **Switaj K, Master A, Skrzypczak M, Zaborowski P. 2005.** Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. Clin Microbiol Infect 11:170-176.

186. **Tenter AM. 2009.** *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104: 364-369.
187. **Tenter AM, Heckeroth A, Weiss LM. 2000.** *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 30: 1217-1258.
188. **Tissot Dupont D, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Bost-Bru C, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. 2003.** Usefulness of Western blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital toxoplasmosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22:122-125.
189. **Triolo-Mieses M, Traviezo-Valles L. 2006.** Seroprevalencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en gestantes del municipio Palavecino, Estado Lara, Venezuela. Kasmera 34(1): 7-13.
190. **Tsai YJ, Chung WC, Fei ACY, Kaphle K, Peng S, Wu YL. 2007.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs from slaughterhouses in Taiwan. J Parasitol 93: 1540-1541.
191. **Tsutsui VS, Navarro IT, Freire RL, Freitas JC, Prudencio LB, Delbem ACB, Marana ERM. 2003.** Seroepidemiologia e fatores associados à transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos do norte do Paraná. Arch Vet Sci 8(2): 27-34.
192. **Turčeková L, Antolová D, Reiterová K, Spišák F. 2013.** Occurrence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in naturally infected pigs. Acta Parasitol 58: 361-366.
193. **Venkatesan P, Wakelin D. 1993.** ELISA for parasitologists: or Lies, Damned Lies and ELISAs. Parasitol. Today 9: 228-232.



194. **Venturini L, Venturini MC, Omata Y, Di Lorenzo C, De Carolls G. 1997.** *Toxoplasma gondii*: La respuesta inmune por IgG durante el periodo patente en un gato doméstico infectado naturalmente. Rev Med Vet 78: 258-260.
195. **Venturini MC, Bacigalupe D, Venturini L, Rambeaud M, Basso W, Unzaga JM, Perfumo CJ. 2004.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sows from slaughterhouses and in pigs from an indoor and outdoor farm in Argentina. Vet Parasitol 124: 161-165.
196. **Veronesi F, Ranucci D, Branciarri R, Miraglia D, Mammoli R, Fioretti DP. 2011.** Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection on finishing swine reared in the Umbria region, central Italy. Zoonoses Public Health 58.
197. **Villari S, Vesco G, Petersen E, Crispo A, Buffolano W. 2009.** Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. Vet Parasitol 161: 1-8.
198. **Vostalová E, Literák I, Pavlásek I, Sedlák K. 2000.** Prevalence of *Toxoplasma gondii* in finishing pigs in a large-scale farm in the Czech Republic. Acta Vet Brno 69: 209-212.
199. **Waltman WD, Dreesen DW, Prickett MD, Blue JL, Oliver DC. 1984.** Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of toxoplasmosis in swine: Interpreting assay results and comparing with other serologic tests. Am. J. Vet. Res. 45: 1719-1725.
200. **Waltman WD, Dreesen DW, Prickett MD, Blue JL, Oliver DC. 1984.** Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of toxoplasmosis in swine: Interpreting assay results and comparing with other serologic tests. Am J Vet Res 45: 1719-1725.

- 201.    **Weissenbock H, Dubey JP. 1993.** Toxoplasmosis epizootic in a pig stock. Dtsch Tierärztl Wschr 100: 370-374.
  
- 202.    **Wiener Lab. 2000.** Toxotest HAI. Prueba de Hemoaglutinación indirecta. Winner Group Lab. Buenos Aires, Argentina. 8 p.
  
- 203.    **Zou FC, Sun XT, Xie YJ, Li B, Zhao GH, Duan G, Zhu XQ. 2009.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs in Southwestern China. Parasitol International 58: 306-307.

## **IX. ANEXOS**

**Anexo 1. Consentimiento Informado para los propietarios de crianzas porcinas.**

Lima-Perú

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
**GRANJAS PORCINAS, LIMA - PERÚ**



Estimado Participante:

Yo Marlene Gonzales Llantoy, bachiller de Medicina Veterinaria de la UNMSM, estoy llevando a cabo como tesis para optar por el título de médico veterinario un estudio sobre: **“Concordancia entre las técnicas de Hemaglutinación Indirecta e Inmunoabsorción Ligado a Enzimas en el diagnóstico de toxoplasmosis porcina”**.

El objetivo del estudio es comparar dos técnicas serológicas para el diagnóstico de *Toxoplasma gondii*, en porcinos del departamento de Lima.

La investigación consta de dos partes:

**Primero:** Presentar el Consentimiento Informado para obtener el permiso de toma de muestra en matadero, así como recabar información general de cada granja, datos generales, costumbres, estado sanitario, manejo, personal de trabajo, etc.

**Segundo:** Para analizar la presencia de anticuerpos se colectarán muestras de sangre de los cerdos de acabado en centros de beneficio. Las muestras serán trasladadas al Laboratorio de Parasitología de la FMV-UNMSM para su respectivo análisis.

La información obtenida a través de este estudio será mantenida bajo estricta confidencialidad y el nombre de la granja no será empleado, se utilizará un sistema de codificación

El estudio no conlleva a ningún riesgo, no recibirá compensación monetaria por su participación. Los resultados serán entregados al director personalmente, si así desea solicitarlos. Si tiene alguna pregunta sobre la investigación, me puede contactar a los teléfonos 979706616 / 4353348- anexo 226 o mi correo electrónico: veterinariazarumilla@gmail.com.

---

He leído y comprendido la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado sobre el tema de investigación: **“Concordancia entre las técnicas de Hemaglutinación Indirecta e Inmunoabsorción Ligado a Enzimas en el diagnóstico de toxoplasmosis porcina”**.

Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento.

Nombre y Firma del Participante

Fecha

## Anexo 2. Protocolo de ELISA indirecto. Priocheck *Toxoplasma* Ab porcine

### PRIOCHECK *Toxoplasma* AB PORCINE



#### MATERIALES DE LABORATORIO

1.	Micropipeta monocal de 10µL	
2.	Micropipeta monocal de 10-100µL	
3.	Micropipeta monocal de 100-1000µL	
4.	Micropipeta multicanal de 20-200µL	
5.	Micropipeta multicanal de 50-300µL	
6.	1 Caja de Tips de 10 µL	
7.	3 Cajas de Tips de 200 µL	
8.	Recipiente de Tips usados	
9.	5 reservorios multicanales	
10.	Placa de dilución de fondo plano	
11.	Probeta de 100ML	
12.	Matraz Erlenmeyer	
13.	Vaso de Precipitado	
14.	Capsula de magneto	
15.	Agua estéril	
16.	Plumón indeleble	
17.	Tijera	
18.	Papel de parafina	
19.	Papel toalla	
20.	Cinta adhesiva	
21.	Caja oscura para ELISA	
22.	Hoja de ELISA	

#### • MATERIAL BIOLÓGICO

1.	Controles positivos fuertes	
2.	Controles positivos débiles	
3.	Controles negativos	
4.	Sueros de porcinos	

#### • REACTIVOS

1.	Diluyente de muestra	
2.	Solución de Lavado	
3.	Diluyente de Conjugado	
4.	Conjugado	
5.	Sustrato Cromógeno	
6.	Solución de Frenado	

• **EQUIPOS**

1.	Shaker (Homenizador)	
2.	Agitador magneto	
3.	Incubadora 22°C	
4.	Lector de ELISA 450nm	

• **PROCEDIMIENTO**

Un día antes de realizar la prueba, se debe trasladar los sueros de congelación (-69°C) a refrigeración (0-4°C).

1.	Colocar los sueros en una plancha codificada.	
2.	Homogenizar cada suero utilizando el shaker.	
3.	Codificar la placa de dilución utilizando el plumón indeleble.	
<b>Preparación de la muestra</b>		
4.	Añadir 90µL de diluyente de muestra a cada pocillo de la placa de dilución.	
5.	Agregar 10 µL de control positivo fuerte a los pocillos A1 y B1 de la placa de dilución sin recubrir y homogenizar tomando y soltando cinco veces.	
6.	Agregar 10 µL de control positivo débil a los pocillos C1 y D1 de la placa de dilución sin recubrir y homogenizar tomando y soltando cinco veces.	
7.	Agregar 10 µL de control negativo a los pocillos E1 y F1 de la placa de dilución sin recubrir y homogenizar tomando y soltando cinco veces.	
8.	Agregar 10µL de las muestras de suero al resto de pocillos de la placa de dilución y homogenizar tomando y soltando cinco veces.	
9.	Pegar con cinta adhesiva la placa de ensayo.	
10.	Añadir 80µL de diluyente de muestra a cada pocillo de la placa de ensayo.	
11.	Transferir 20µL de las muestras diluidas y de sus controles de la placa de dilución a la placa de ensayo y mezclar tomando y soltando la muestra 5 veces con la pipeta.	
<b>Incubación de la muestra</b>		
12.	Tapar la placa de ensayo con el papel de parafina y colocar en la caja oscura.	
13.	Llevar a la incubadora y dejar incubando a 22±3°C (Prom. 22°C) durante 60 minutos	
14.	Preparar la solución de trabajo de líquido de lavado mezclando 270 mL de agua estéril y 30 mL de solución de lavado, homogenizar en el Matraz Erlenmeyer	
15.	Preparar la solución de trabajo Conjugado mezclando en un vaso de precipitado 11 600 mL de diluyente de conjugado y 400mL de Conjugado, homogenizar utilizando el agitador magneto.	
<b>Lavado y Conjugado</b>		
16.	Lavar la placa de ensayo 4 veces con 200µL de la solución de trabajo de líquido de lavado.	
17.	Añadir 100µL de conjugado diluido a cada pocillo de la placa de ensayo	
18.	Incubar la placa de ensayo a 22±3°C (Prom. 22°C) durante 60 minutos.	

19.	Lavar la placa de ensayo 4 veces con 200µL de la solución de trabajo de líquido de lavado.	
20.	Eliminar el líquido restante golpeando la placa sobre el papel absorbente	
<b>Detección</b>		
21.	Agregar 100µL de Sustrato cromógeno (TMB) a cada pocillo de la placa de ensayo.	
22.	Incubar la placa de ensayo a 22±3°C (Prom. 22°C) durante 15 minutos	
23.	Agregar 100µL de solución de frenado en el mismo orden en que se agregó la solución de sustrato cromógeno (TMB).	
24.	Agitar manualmente la placa de ensayo durante 5-10 segundos.	
25.	Leer la placa de ensayo en el Lector de ELISA a 450nm antes de 15 minutos (Recomendación: Usar Filtro de 620nm).	

## • INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

### Calculo de Resultados

$$\frac{OD\ 450nm\ Muestra - OD450nm\ Control\ negativo}{D\ 450nm\ Control\ positivo - OD450nm\ Control\ negativo} * 100 = \% Positividad$$

### Criterios de Validación

- La OD<sub>450</sub> media de los controles positivos debe ser >1.2
- El porcentaje de positividad (PP) promedio de los controles positivos débiles debe ser >35%
- La OD<sub>450</sub> media de los controles negativos debe ser <0.15

Si no se cumplen estos criterios, los resultados no son válidos y debe volver a analizar la prueba.

### Interpretación de resultados

- Se toma como punto de corte un valor de PP=20%
- Los resultados iguales o superiores del 20% de PP se consideran positivos.
- Los resultados inferiores al 20% de PP se consideran negativos.

### Anexo 3. Protocolo de HAI Toxotest

#### TOXOTEST. Wiener Lab



#### MATERIALES DE LABORATORIO

1.	Micropipeta monocal de 10-100µL	
2.	Micropipeta multicanal de 20-200µL	
3.	Cajas de Tips de 200 µL	
4.	Recipiente de Tips usados	
5.	Reservorios multicanales	
6.	Placa de dilución de fondo U	
7.	Plumón indeleble	
8.	Tijera	
9.	Papel de parafina	
10.	Caja oscura	
11.	Hoja de HAI	

#### MATERIAL BIOLOGICO

1.	Controle Positivo	
2.	Controle Negativo	
3.	Antígeno HAI	
4.	Globulos rojos no sensibilizados	
5.	Sueros de porcinos	

#### REACTIVOS

1.	Buffer HAI	
2.	Reconstituyente HAI	
3.	Solucion Proteica	

#### EQUIPOS

1.	Shaker (Homenizador)	
3.	Incubadora 22°C	

#### PROCEDIMIENTO

Un día antes de realizar la prueba, se debe trasladar los sueros de congelación (-69°C) a refrigeración (0-4°C).

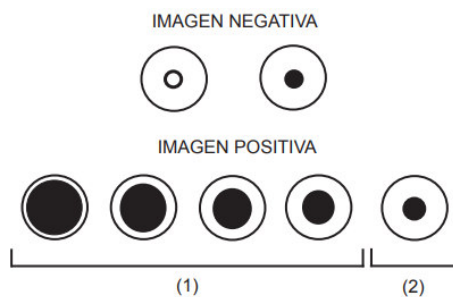
1.	Colocar los sueros en una plancha codificada.	
2.	Homogenizar cada suero utilizando el shaker.	



3.	Codificar la placa de dilución utilizando el plumón indeleble.	
<b>Preparación de la muestra</b>		
4.	Mezclar el Antígeno HAI con 5.2ml de Reconstituyente HAI	
5.	Mezclar 0.2ml de Solucion Proteica con 10ml de Buffer	
6.	Agregar 25 µL de buffer en cada pocillo a utilizar	
7.	Agregar 25 µL de cada control y de los sueros a la Fila 1	
8.	Realizar diluciones a partir de la Fila 1 (Dilucion ½) hasta la Fila 12 (Dilucion 1/4096).	
9.	Colocar en las filas 1 y 2, 25 µL de globulos rojos no sensibilizados para el control de heterofilia.	
10.	En el resto de los pocillos, agregar 25 µL de Antígeno HAI	
11.	Agitar la placa golpeando con los dedos durante 30 segundos	
<b>Incubación de la muestra</b>		
12.	Tapar la placa de dilucion con el papel de parafina y colocar en la caja oscura.	
13.	Llevar a la incubadora, dejar incubando a 22 ± 3°C (Prom. 22°C) durante 90 minutos	
<b>Lectura</b>		
14.	Leer la placa de dilución utilizando un espejo, iluminando la placa desde arriba e interponiendo un papel blanco entre la placa y la fuente de luz.	

#### • INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Títulos  $\geq 64$  significan mayor probabilidad de infección a *T. gondii*. A fin de determinar una primoinfección reciente deben procesarse 2 muestras tomadas con un intervalo de 2-3 semanas. Un aumento de título mayor de 2 diluciones entre la 1ra y 2da muestra indican infección recientemente adquirida.



- (1) Manto  
(2) Punto Final (50%)

**No Reactivo:** Presencia de un sedimento en forma de botón o pequeño anillo de bordes regulares.

**Reactivo:** Formación de una película o manto que cubre el 50% o más del fondo de los pocillos.